

Universidade de Lisboa  
Faculdade de Farmácia  
Departamento de Química Farmacêutica e Terapêutica



**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO POR  
ESPECTROMETRIA DE MASSA COM IONIZAÇÃO POR  
ELECTROSPRAY DE ANTIMALÁRICOS QUE ATUAM  
NA CADEIA MITOCONDRIAL DE TRANSPORTE DE  
ELETRÕES**

**Doutoramento em Farmácia**

Especialidade em Química Farmacêutica e Terapêutica

**Ana Raquel Fernandes Siteo**

Tese orientada pelo Professor Doutor Rui Alves Moreira e coorientada pela Professora Doutora M<sup>a</sup> do Rosário Gonzaga Bronze, especialmente elaborada para a obtenção do grau de Doutor

2015



Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia

Departamento de Química Farmacêutica e Terapêutica



**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO POR  
ESPECTROMETRIA DE MASSA COM IONIZAÇÃO POR  
ELECTROSPRAY DE ANTIMALÁRICOS QUE ATUAM NA  
CADEIA MITOCONDRIAL DE TRANSPORTE DE ELETRÕES**

**Ana Raquel Fernandes Siteo**

**Doutoramento em Farmácia**

Especialidade em Química Farmacêutica e Terapêutica

**2015**



Este trabalho foi desenvolvido sob orientação do Professor Doutor Rui Alves Moreira e da Professora Doutora Maria do Rosário Gonzaga Bronze, no iMed.UL (Research Institute for Medicines and Pharmaceutical Sciences) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

O trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia no âmbito do Programa Ciência Global através da bolsa de doutoramento SFRH/BD/51459/2011

This work was developed under scientific guidance of Dr. Rui Alves Moreira and Dr. Maria do Rosário Bronze at iMed.UL (Research Institute for Medicines and Pharmaceutical Sciences), Faculty of Pharmacy, University of Lisbon.

The work was financially supported by Fundação para a Ciência e Tecnologia, within the framework of Programa Ciência Global, through the doctoral grant SFRH/BD/51459/2011



*Ao Absa*

*À Lorena, Elisa Raquel,*

*Carmen e Karen*





*“Todos os dias me levanto e penso que não temos idade, temos vida. E mesmo estando sempre preparados para partir e chegar, devemos fundamentar a nossa existência numa obra, em marcar o espaço onde passamos, porque essa é a obrigação divina de todo o ser humano”*

**Professora Doutora Odete Ferreira**

**FFULisboa 4-12-2014**







---

## AGRADECIMENTOS

Embora seja difícil expressar a minha gratidão a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

- Ao Professor Doutor Rui Alves Moreira, pela orientação e por todos ensinamentos que contribuíram para a evolução do meu pensamento científico. O seu extraordinário empenhamento e incentivo, além da permanente disponibilidade para resolver todos os problemas e dúvidas que foram surgindo, foram inestimáveis.
- A Professora Doutora Maria do Rosário Bronze, pela sua preciosíssima e dedicada orientação e pela revisão crítica da presente dissertação. Agradeço imenso pela amizade, motivação, confiança e sobretudo pelas palavras de estímulo que sempre me soube dirigir.
- À Professora Doutora Ana Coelho Varela, do IQTB, por todos os ensinamentos e pelas facilidades concedidas para a caracterização dos compostos no espectrómetro de massa com analisador de armadilha de iões.
- Aos Doutores Tiago Rodrigues e Ana Ressurreição, ao Daniel Gonçalves e Daniela Miranda pela síntese dos compostos que deram corpo à esta dissertação,
- Ao Doutor Paulo Madeira, pela amizade, incentivo e sobretudo por todos os conhecimentos científicos transmitidos durante a realização desta dissertação.
- Às Professoras Doutora Francisca Lopes, Maria de Jesus Perry e Maria de Fátima Simões pelo carinho, amizade e simpatia dispensadas,
- Ao João Ferreira, Ana Teresa, Edite Torres, Joana Magalhães e Alexandra Cardoso, amigos que dispenso o tratamento pelo título, vai o meu muito obrigado pelo carinho, amizade, incentivo e por todo o apoio prestado durante a execução deste trabalho,
- Aos meus colegas e amigos, do MedChem, especialmente, ao Carlos Ribeiro, Ana Rita

---

Duarte, Ana Ressurreição, Sara Silva e a todos os que passaram pelo laboratório e que me presentearam com a sua boa disposição, paciência e amizade durante a minha permanência no grupo.

Cumpre-me ainda agradecer:

- Ao Ministério da Saúde da República de Moçambique, instituição onde me encontro vinculada pela oportunidade que me foi concedida para enriquecer os meus conhecimentos.
- À Fundação para a Ciência e Tecnologia, pela concessão da Bolsa de Doutoramento, SFRH/BD/51459/2011, no âmbito do Programa Ciência Global, para a investigação na Faculdade de Farmácia de Lisboa, assim como por todo o apoio financeiro concedido no âmbito da minha formação.

#### **Um agradecimento muito especial**

- Ao meu primo Nando, a quem confesso, não ter palavras suficientes para o agradecer pela sua permanente presença, apoio e carinho dedicado à minha família, principalmente nestes últimos anos, durante a minha ausência.
- Ao meu esposo Absalão e as nossas 4 filhas, Lorena Alexandra, Elisa Raquel, Cármen Felicidade e Karen Genisse, que durante todo o tempo da minha formação, foram presencialmente privados do meu carinho, atenção e companhia, mas que, nem por isso, deixaram de me amar, apoiar, incentivar e principalmente permitir e perceber a razão desta minha ausência. Para vocês meus queridos, vai o meu profundo **MUITO OBRIGADO** e a certeza de podermos estar novamente juntos muito em breve.

**Do fundo do coração, este trabalho, é especialmente dedicado à vocês**

---

## RESUMO

A rápida proliferação e o alastramento dos parasitas resistentes a fármacos antimaláricos traduzem-se pelo crescente aumento do número de infeções e de mortes devidas à malária. Assim, torna-se imperativo o desenvolvimento de novos antimaláricos que atuem sobre mecanismos distintos e em alvos terapêuticos pouco explorados.

A espectrometria de massa (MS) tem demonstrado ser uma ferramenta analítica crucial na caracterização estrutural e na previsão da estabilidade de compostos incluindo os antimaláricos. Devido à sua elevada sensibilidade, rapidez, possibilidade de automatização, o seu acoplamento como a cromatografia líquida (LC-MS/MS), permite obter informações sobre o perfil farmacocinético, deteção e identificação de metabolitos.

No âmbito desta dissertação, a espectrometria de massa com ionização por electrospray e analisador do tipo triplo quadrupolo foi aplicada no estudo da fragmentação de um conjunto de compostos derivados das quinolon-4(1*H*)-iminas e de derivados endoperóxidos híbridos da primaquina–artemisinina (PQ-ART), que demonstraram capacidade para atuar nas fases hepática e sanguínea do parasita da malária. Os estudos conduzidos por HPLC permitiram avaliar a estabilidade metabólica, em microsomas de fígado de rato. A pesquisa e deteção de metabolitos basearam-se na monitorização da área dos picos cromatográficos das moléculas precursoras e na pesquisa de iões específicos pelo modo de Monitorização Seletiva de Iões (SIM). A identidade dos metabolitos foi confirmada por comparação dos padrões de fragmentação dos mesmos e das moléculas precursoras. Os resultados obtidos permitiram concluir que *i*) a N-desalquilação é a principal via de fragmentação dos compostos submetidos ao estudo; *ii*) a estabilidade das 4-quinolon-(1*H*)-iminas em enzimas hepáticas é condicionada pela extensão da cadeia alquílica e *iii*) os híbridos da PQ-ART, apresentam elevadas taxas de metabolização, que podem ser reduzidas com a incorporação de substituintes volumosos na posição de bloqueio da toxicidade da PQ. Os resultados mostram que os metabolitos formados por N-desalquilação, desaminação oxidativa e hidroxilação são resultado da atividade das enzimas CYP P450 no anel quinolínico da PQ.

**Palavras chaves:** Malária, antimaláricos, MS-ESI, LC-MS/MS, metabolitos

---



---

## ABSTRACT

The emergence and rapid spread of resistant parasites to well established antimalarial drugs are reflected by the increasing number of infections and deaths due to malaria. Thus, it is imperative to develop new antimalarial drugs for the prophylaxis and treatment that act by different mechanisms and on unexplored therapeutic targets.

Mass spectrometry (MS) has been shown to be a crucial analytical tool for the structural characterization and stability prediction of new drug candidates. Due to its high sensitivity, speed, possibility of automation of equipment, its coupling with liquid chromatography (LC-MS/MS) provides information on the pharmacokinetic profile, detection and identification of metabolites and impurities.

In the present dissertation, the MS with electrospray ionization (ESI-MS) with a triple quadrupole analyzer was applied to the study of fragmentation behavior of a selected set of 4-quinolon-(1*H*)-imines derivatives and endoperoxide hybrids derivatives of primaquine-artemisinin (PQ-ART), which showed the ability to act in both liver and blood stage of the malaria parasite. Through studies conducted by HPLC it was possible to evaluate the chemical and metabolic stability of compounds in rat liver microsomes. The search and detection of metabolites were based on the monitoring of peaks's chromatographic area of the precursor molecules and on the specific ion search mode by Selective Ion Monitoring (SIM). The identity of the metabolites was confirmed by correlation between fragmentation pattern of these products and precursor molecules.

The obtained results allowed to conclude that *i*) N-dealkylation is the major route of fragmentation, *ii*) the stability of 4-quinolon-(1*H*)-imines in hepatic enzymes is conditioned by the extent of the alkyl chain which is characteristic of N-alkylamine derivatives and that *iii*) hybrids of PQ- ART show higher rates of metabolism, that can be reduced with the incorporation of bulky substituent in the locking position of the PQ's toxicity.

In conclusion, the metabolites formed by N-dealkylation, oxidative deamination and hydroxylation are the result of the activity of CYP enzymes in the quinoline moiety of PQ.

**Keywords:** Malaria, antimalarial compounds, MS-ESI, LC-MS/MS, metabolites

---

---

# ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS .....	i
RESUMO .....	iii
ABSTRACT .....	v
ÍNDICE GERAL .....	vii
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xiii
ÍNDICE DE TABELAS .....	xix
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	xx

## CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

1.1 - Malária ou Paludismo .....	1
1.1.1- Ciclo de Vida do Parasita da Malária .....	2
1.1.2 - Fármacos Antimaláricos .....	3
1.1.2.1 – Compostos que Atuam na Fase Hepática: 8-Aminoquinolinas .....	8
1.1.2.2 – Compostos que Atuam na Fase Sanguínea .....	10
1.2 - Espectrometria de Massa.....	14
1.2.1 - Princípios Básicos .....	14
1.2.2 - Técnicas de Ionização: Ionização por Electrospray (ESI).....	17
1.2.3 – Analisadores de Massa.....	20
1.2.3.1 - Analisadores de Massa do Tipo Quadrupolo .....	20
1.2.4 - Espectrometria de Massa em Tandem MS <sup>n</sup> .....	23
1.2.4.1 - Dissociação Induzida por Colisão.....	26

---

1.2.5 - Contribuição da Espectrometria de Massa na Análise de Antimaláricos .....	28
1.2.5.1 - Elucidação Estrutural .....	28
1.2.5.2 - Estudos Farmacocinéticos.....	29
1.2.5.3 - Estudos de Estabilidade .....	32
1.2.5.4 – Detecção de Fraudes e Falsificações.....	32
1.2.5.5 – Diagnóstico da Malária .....	33
1.3 - Metabolismo dos Fármacos.....	34
1.3.1 - Generalidades .....	34
1.3.2 - Sistemas Enzimáticos .....	35
1.3.3 - Reações de Biotransformação .....	36
1.3.3.1 - Reações de Fase I.....	37
1.3.3.2 - Reações de Fase II .....	39
1.3.4 - Estabilidade Metabólica .....	39
1.3.5 - Metabolismo da Primaquina.....	40
1.3.6 - Metabolismo da Artemisinina e Derivados Semi-Sintéticos.....	43
1.4 – Objectivo da Tese .....	45

## **CAPITULO II - DERIVADOS DAS QUINOLON-4(1*H*)-IMINAS**

2 – Derivados das Quinolona-4(1 <i>H</i> )-iminas .....	49
2.1 - Identificação e Caracterização Estrutural.....	49
2.1.1 - Resultados e Discussão .....	50
2.2 – Avaliação da Estabilidade Metabólica.....	70
2.2.1 – Resultados e Discussão .....	71
2.3 – Detecção e Identificação de Metabolitos.....	78

---

2.3.1 - Discussão dos Resultados .....	79
--	----

### **CAPITULO III - DERIVADOS ENDOPERÓXIDOS HÍBRIDOS DA PQ-ART**

3 – Derivados Endoperóxidos Híbridos da PQ e ART .....	99
3.1 - Identificação e Caraterização Estrutural .....	99
3.1.1 - Resultados e Discussão .....	100
3.2 – Avaliação da Estabilidade Metabólica .....	111
3.2.1 – Resultados e Discussão .....	112
3.3 – Detecção e Identificação de Metabolitos .....	115
3.3.1 - Discussão dos Resultados .....	115

### **CAPITULO IV - CONCLUSÕES**

4 - Conclusões .....	147
----------------------	-----

### **CAPITULO V - PARTE EXPERIMENTAL**

5.1 – Procedimento Experimental para a Avaliação das Quinolon-4(1H)-iminas .....	153
5.1.1 – Identificação e Caracterização Estrutural .....	153
5.1.1.1 -Equipamento .....	153
5.1.1.2 - Material e Reagentes Gerais .....	155
5.1.1.3 – Preparação das Amostras .....	156
5.1.2 – Avaliação da Estabilidade Metabólica .....	156
5.1.2.1 – Equipamento .....	156
5.1.2.2 – Material, Reagentes e Solventes .....	159
5.1.2.3 – Preparação das amostras .....	160
5.1.3 – Detecção e Identificação de Metabolitos .....	162

---

5.1.3.1 - Equipamento .....	162
5.1.3.2 - Material e Reagentes.....	163
5.1.3.3 – Preparação das Amostras .....	163
5.2 – Procedimento Experimental para a Avaliações dos Derivados Endoperóxidos Tetraoxanos .....	164
5.2.1 – Identificação e Caracterização dos Compostos .....	164
5.2.2 – Avaliação da Estabilidade Metabólica por HPLC .....	164
5.2.2.1 – Equipamento .....	164
5.2.2.2 – Preparação das Amostras .....	164
5.2.3 – Detecção e Identificação de Metabolitos .....	165
5.2.3.1 – Equipamento .....	165
5.2.3.2 – Preparação das Amostras .....	166
6 - Referências Bibliográficas .....	169
ANEXOS .....	150

---

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Reação de oxidação (Fase I) mediada pelo sistema enzimático do citocromo P450 .....	38
Esquema 2 - Via metabólica proposta para a cadeia lateral da PQ 8, (adaptada a partir da ref.[41]) .....	41
Esquema 3 - Metabolismo (Fase I e II) do arteeter 7d (adaptada a partir da ref. [157]).	44
Esquema 4 – Mecanismo de fragmentação proposto, para a formação do par ião-molécula, a partir das moléculas protonadas de 40 e 41 .....	57
Esquema 5 - Mecanismo de fragmentação das moléculas protonadas de 40 e 41 .....	60
Esquema 6 - Mecanismo de fragmentação das moléculas protonadas 40 e 41, conducente á formação dos iões $m/z$ 239 e 273 respetivamente .....	61
Esquema 7 - Mecanismo de fragmentação de 41 que origina o ião produto $m/z$ 295 ....	61
Esquema 8 – Mecanismo de fragmentação proposto para a formação dos iões $m/z$ 167, 152, e 141 a partir das moléculas protonadas dos compostos 40 e 41 .....	62
Esquema 9 - Mecanismo de fragmentação das frações protonadas $m/z$ 126, 128 e $m/z$ 114 característicos dos compostos 44-47, 50 e 51 .....	63
Esquema 10 – Mecanismo de fragmentação das frações protonadas $m/z$ 100 e 98 características de 42, 43, 48 e 49.....	64
Esquema 11 – Mecanismo adicional de fragmentação das moléculas protonadas 46 e 47 .....	64
Esquema 12 - Padrão de fragmentação das moléculas protonadas dos compostos 40 e 41 .....	67
Esquema 13 - Padrão de fragmentação das moléculas protonadas dos compostos 42-51 .....	68

---

Esquema 14 – Via de metabolização de 40,41 e 44, conducente à formação dos metabolitos A: $m/z$ 331 e 365 (40 e 41) e B: $m/z$ 375 e 472 (40 e 44) .....	96
Esquema 15 – Iões produto da molécula protonada de <b>52</b> , formados na fonte entre 30 e 70V .....	103
Esquema 16 - Iões produto da molécula protonada de <b>54</b> formados na fonte entre 50 e 70V .....	104
Esquema 17 - Iões produto da molécula protonada de <b>55</b> formados na fonte entre 20 e 70V .....	105
Esquema 18 - Mecanismo de fragmentação das moléculas protonadas de 53-55 quando aplicada a energia de colisão entre 25 e 30eV. ....	107
Esquema 19 – Mecanismo de fragmentação da molécula protonada de 52 quando aplicada a energia de colisão entre os 10 e os 25eV .....	108
Esquema 20 - Mecanismo de fragmentação de $m/z$ 333 quando aplicada a energia de colisão entre os 15 e os 30eV .....	123
Esquema 21 – Via de metabolização da molécula protonada de 52, conducente à formação do metabolito $m/z$ 333 .....	124
Esquema 22 – Padrão de fragmentação do metabolito $m/z$ 688 na mistura reacional $t_{2h}$ .....	137
Esquema 23 – Via de metabolização de 54, conducente à formação do metabolito $m/z$ 688.....	138
Esquema 24 – Via de metabolização da molécula protonada de 55, conducente à formação do metabolito $m/z$ 260. ....	143
Esquema 25 - Reação enzimática de transformação do <i>p</i> -nitrofenol a <i>p</i> -nitrocatecol, mediada pelo CYP2E1 .....	157



---

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa representativo da distribuição da malária a nível mundial (adaptada a partir da ref. [8]).....	1
Figura 2 – Ciclo de vida dos plasmódios da malária, no homem e no mosquito (adaptada a partir da ref. [13] ) .....	2
Figura 3 – Estrutura química de alguns fármacos antimaláricos .....	4
Figura 4 – Estrutura do Complexo bc1 (adaptada a partir da ref. [23]) .....	5
Figura 5 – Cadeia de transporte de eletrões na membrana mitocondrial dos parasitas <i>Plasmodium</i> (adaptada e consultada em <a href="http://www.towardsoneworld.eu">www.towardsoneworld.eu</a> ) .....	6
Figura 6 – Derivados semi-sintéticos da artemisinina.....	7
Figura 7 – Estrutura da primaquina 8 e da pamaquina 12 .....	8
Figura 8 – Estrutura da carboxiprimaquina 13 .....	9
Figura 9 – Derivados da primaquina .....	10
Figura 10 – Derivados endoperóxidos sintéticos da ART .....	11
Figura 11 – Estrutura química dos derivados das piridonas .....	12
Figura 12 – Mecanismo de conversão de moléculas na fase gasosa em espécies iónicas (adaptada a partir da ref.[69]).....	14
Figura 13 – Componentes básicos de um espectrómetro de massa (adapatada a partir da ref. [71]) .....	15
Figura 14 - Representação esquemática de uma fonte ESI a operar em modo positivo (consultada em <a href="http://www.waters.com">www.waters.com</a> ) .....	18
Figura 15 - Representação esquemática dos possíveis mecanismos para a formação de iões na fase gasosa (A) CRM e (B) IEM (adaptada a partir da ref. [69]) .....	19
Figura 16 – Representação esquemática de um analisador do tipo quadrupolo (adaptada	

---

e consultada em <a href="http://www.chem.vt.edu/chem-ed/ms/quadrupo.html">http://www.chem.vt.edu/chem-ed/ms/quadrupo.html</a> ).....	21
Figura 17 – Representação esquemática de um analisador do tipo triplo quadrupolo (adaptada e consultado em <a href="http://www.waters.com">www.waters.com</a> ).....	22
Figura 18 – Representação Esquemática do analisador de armadilha de iões (adaptada a partir da ref. [72]) .....	22
Figura 19 - Elucidação dos diferentes tipos de varrimentos (adaptada e consultada em <a href="http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/tandem-ms.html">http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/tandem-ms.html</a> ) .....	24
Figura 20 - Derivados obtidos por oxidação da primaquina .....	28
Figura 21 – Estrutura das 4-imidazolidinonas derivadas da primaquina .....	29
Figura 22 – Estrutura do NPC1161 .....	30
Figura 23 – Estrutura química dos antimaláricos trioxanos .....	31
Figura 24 – Distribuição das enzimas CYP no metabolismo de fármacos.....	36
Figura 25 - Representação esquemática do modo de ocorrência das reações de fase I e II durante a biotransformação (adaptada da ref [121]) .....	37
Figura 26 - Ciclo catalítico do citocromo P450 A (adaptado a partir da ref. [138]).....	38
Figura 27 - Metabolitos hidroxilados da primaquina [41].....	42
Figura 28 – Metabolitos diméricos da PQ N-acetilada (adaptada da ref: [41]).....	42
Figura 29 – Metabolitos inativos da artemisinina .....	43
Figura 30 - Estrutura geral dos derivados das quinolon-4(1 <i>H</i> )-iminas .....	49
Figura 31 - Efeito da variação da voltagem do capilar no sinal instrumental obtido para o $m/z$ 359 característico de 40 .....	51
Figura 32 - Variação da intensidade de sinal, obtido para o $m/z$ 359 característico de 40, em função da voltagem de cone aplicada.....	52
Figura 33 – Espectro MS correspondente: A) $m/z$ 359 de 40 (X = Cl); B) $m/z$ 393 de 41 (X = CF <sub>3</sub> ) a valores de potencial $\leq 60V$ .....	54

---

---

Figura 34 - Espectro MS que ilustra a formação do íon produto A) $m/z$ 331 (40) B) $m/z$ 365 (41) a valores de potencial de 60 V .....	55
Figura 35 – Íões produto formados na fonte a valores de potencial $\geq 40V$ resultantes da <i>N</i> -desalquilação das quinol-4-iminas 42-51 .....	56
Figura 36 - Espectros MS/MS das moléculas protonadas A) 40 e B) 41 .....	58
Figura 37 - Espectros MS/MS das moléculas protonadas $[M+D]^+$ A) 40 e B) 41 .....	59
Figura 38 – Íões resultantes da fragmentação dos picos isotópicos $^{35}Cl$ e $^{37}Cl$ , na molécula protonada de 40 .....	60
Figura 39 – Traçado da reta de calibração, que correlaciona a absorvência em função da concentração do padrão <i>p</i> -nitrocatecol.....	73
Figura 40 - Correlação entre o $\ln$ (Área) em função do tempo para a metabolização do composto 40 em enzimas hepáticas, a 37°C.....	75
Figura 41 – A) Cromatograma e B) Espectro de massa do íon extraído $m/z$ 359 da molécula protonada do composto 40 com $t_r = 6,60$ min .....	80
Figura 42 - A) Cromatograma e B) Espectro de massa da molécula protonada de $m/z$ 331 com $t_r=6,28$ min .....	81
Figura 43 – Espectros de MS/MS A) de $[M+H]^+$ $m/z$ 359 obtido por aplicação de uma energia de colisão de 35eV B) de $m/z$ 331 obtido por aplicação de uma energia de colisão de 50eV .....	82
Figura 44 - Cromatogramas MRM da molécula protonada do composto 40 ( $359 > 331$ ) e do possível metabolito ( $331 > 152$ ) nos $t_{0h}$ e $t_{6h}$ .....	83
Figura 45 – Cromatogramas do ACN, microsossomas e da molécula protonada do composto 40, nas misturas reacionais dos tempos $t_{0h}$ $t_{6h}$ e $t_{24h}$ .....	84
Figura 46 – Espectros de massa A) da molécula protonada de 40 $m/z$ 359 e B) do possível metabolito hidroxilado $m/z$ 375 na mistura reacional $t_{6h}$ .....	85

---

---

Figura 47 – Espectros de MS/MS A) da molécula protonada do composto 40 e B) do metabolito $m/z$ 375, obtidos a 45eV .....	86
Figura 48 – Metabolitos suscetíveis de se formarem a partir da molécula protonada do composto <b>40</b> (adaptada da ref.[132]).....	87
Figura 49 – A) Cromatograma e B) Espectro de massa da molécula protonada do composto 41 com o $t_r=6,70$ min .....	88
Figura 50 - A) Cromatograma e B) Espectro de massa da molécula protonada de $m/z$ 365 com $t_r=6,45$ min .....	89
Figura 51 - Cromatogramas MRM da molécula protonada do composto 41 ( $393> 365$ ) e do metabolito ( $365> 152$ ) nos $t_{0h}$ e $t_{6h}$ .....	90
Figura 52 – A) Cromatograma e B) Espectro de massa da molécula protonada do composto 44 com o $t_r=6,60$ min .....	91
Figura 53 – Cromatograma da molécula protonada do composto 44 nas alíquotas $t_{0h}$ , $t_{6h}$ e $t_{24h}$ .....	92
Figura 54 – Cromatogramas da molécula protonada do composto 44, nas misturas reacionais dos tempos $t_{0h}$ e $t_{6h}$ . ....	93
Figura 55 – Espectro de massa da molécula protonada de $m/z$ 472, possível metabolito hidroxilado, na mistura reacional $t_{6h}$ .....	94
Figura 56 – Metabolitos suscetíveis de se formarem a partir da molécula protonada de <b>44</b> (adaptada da ref.[132]) .....	95
Figura 57 - Estrutura geral dos derivados tetraoxanos .....	99
Figura 58 – Compostos 52, 53, 54 e 55 selecionados para o estudo .....	100
Figura 59 - Efeito da variação da voltagem do capilar no sinal instrumental obtido para as moléculas protonadas dos derivados tetraoxanos 52, 53 e 54 .....	101
Figura 60 - Variação da intensidade de sinal dos iões detetados, correspondentes à	

---

---

molécula protonada do composto 52 em função da voltagem de cone aplicada...	102
Figura 61 – Espectro MS/MS característico para as moléculas protonadas dos compostos 53, 54 e 55 quando aplicada a energia de colisão de 30eV.....	106
Figura 62 – Espectro MS/MS e mecanismo de fragmentação d a molécula protonada de 52 quando aplicada a energia de colisão entre 30 e 45eV .....	110
Figura 63 - Cromatogramas do ião extraído $m/z$ 656 da molécula protonada do composto 54, em homogenato de fígado de rato, nas misturas reacionais $t_{0h}$ e $t_{2h}$	113
Figura 64 – A) Cromatograma e B) Espectro de massa da molécula protonada do composto 52 com $t_r=10,8$ min .....	116
Figura 65 – Cromatogramas do ião extraído $m/z$ 350, nas misturas reacionais $t_{0h}$ , $t_{1h}$ e $t_{2h}$ , da molécula protonada do composto 52 .....	117
Figura 66 – Comparação dos cromatogramas da molécula protonada do composto 52 nas misturas reacionais $t_{0h}$ , $t_{1h}$ e $t_{2h}$ .....	118
Figura 67 – A) Cromatogramas e B) Espectros de massa do ião extraído $m/z$ 287 nos $t_{1h}$ e $t_{2h}$ .....	119
Figura 68 - Padrão de fragmentação de $m/z$ 287 ente os 10 e 15eV .....	120
Figura 69 – Metabolitos previstos, para o composto 52, de acordo com o <i>software MetaPrint2D</i> .....	121
Figura 70 – Espectro MS/MS de $m/z$ 333, obtido por aplicação de energias de colisão entre 15 e 30eV .....	122
Figura 71 – A) Cromatograma e B) Espectro de massa da molécula protonada do composto 53 com $t_r = 22,06$ min .....	125
Figura 72 – Cromatograma do ião extraído $m/z$ 644 nas misturas reacionais $t_{0h}$ , $t_{1h}$ e $t_{2h}$ , do composto 53 .....	126
Figura 73 – Metabolitos previstos para a molécula protonada do composto 53 de acordo	

---

com o <i>software MetaPrint2D</i> .....	127
Figura 74 – Padrão de fragmentação das moléculas protonadas dos compostos na mistura reacional $t_{1h}$ : A) de 53 quando aplicada a energia de colisão de 25eV; B) de $m/z$ 660 quando aplicada a energia de colisão a 20eV .....	129
Figura 75 – A) Cromatograma e B) Espectro de massa da molécula protonada do composto 54 com $t_r = 23,13$ min.....	130
Figura 76 - Cromatogramas do ião extraído $m/z$ 656, nas misturas reacionais $t_{0h}$ , $t_{1h}$ e $t_{2h}$ , do composto 54 .....	131
Figura 77 – Espectro de massa da molécula protonada do composto 54 .....	132
Figura 78 – Espetros de massa obtido após infusão direta de 54 em: A) 80%de ACN + (20% $H_2O$ +0,5% $HCOOH$ ), B) 1%de ACN + (99% $H_2O$ +0,5% $HCOOH$ ); C) 99%de ACN + (1% $H_2O$ +0,5% $HCOOH$ );D) ACN .....	133
Figura 79 - Metabolitos previstos para o composto 54, de acordo com o <i>software MetaPrint2D</i> .....	135
Figura 80 – Espectro MS/MS do metabolito $m/z$ 688 na mistura reacional $t_{2h}$ obtido por aplicação de energias de colisão entre 20 e 30eV .....	136
Figura 81 – A) Cromatograma e B) Espectro de massa da molécula protonada do composto 55 com $t_r = 20,54$ min.....	139
Figura 82 – A: Cromatogramas do ião extraído $m/z$ 566 nas misturas reacionais $t_{0h}$ , $t_{1h}$ e $t_{2h}$ , do composto 55 .....	140
Figura 83 – A: Cromatogramas do ião extraído $m/z$ 260 na solução da PQ e nas misturas reacionais $t_{0h}$ , e $t_{2h}$ .....	141
Figura 84 – Espectro MS/MS de $m/z$ 260 A) na mistura reacional $t_{0h}$ e B) na solução da PQ obtido a uma energia de 15eV.....	142

---

---

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Efeito da variação da voltagem de cone na estabilidade dos iões .....	53
Tabela 2 – Padrão de fragmentação de 40-51 no espectrómetro de massa com analisador QIT .....	69
Tabela 3 – Parâmetros otimizados por HPLC usados para a determinação da estabilidade metabólica de 40-51 .....	72
Tabela 4 – Valores de atividade experimental obtidos para a enzima CYP2E1 .....	74
Tabela 5 – Valores de $k_{obs}$ e $t_{1/2}$ obtidos após a avaliação da estabilidade metabólica dos compostos 40 e 41 .....	76
Tabela 6- Percentagem remanescente após 6h de incubação em homogenato de fígado de rato, a 37°C calculada para os compostos 42–51 .....	77
Tabela 7 – Tempos de retenção obtidos para os derivados tetraoxanos .....	112
Tabela 8 – Valores de $t_{1/2}$ dos derivados tetraoxanos .....	114

---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

---

ACN	Acetonitrilo
ACT	Terapia Combinada da Artemisinina ( <i>Artemisin Combined Therapy</i> )
APCI	Ionização Química à Pressão Atmosférica ( <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i> )
ARM	Artneter
ART	Artemisinina
CAD	Dissociação Ativada por Colisão ( <i>Collisionally Activated Dissociation</i> )
CID	Dissociação Induzida por Colisão ( <i>Collision-Induced Dissociation</i> )
CP	Potencial do Capilar ( <i>Capilar Potential</i> )
CPQ	Carboxiprimaquina
CRM	Modelo de Carga Residual ( <i>Charged Residue Model</i> )
CYP	Citocromo
Da	Dalton
DART	Análise Direta em Tempo Real ( <i>Direct Analysis in Real Time</i> )
DC	Corrente Direta (direct current)
DESI	Dessorção por Ionização por Electrospray ( <i>Desorption Electrospray Ionization</i> )
DFT	Teoria dos Funcionais da Densidade ( <i>Density Functional Theory</i> )
DHA	Dihidroartemisinina
EC	Energias de Colisão
EI	Ionização Eletrónica ( <i>Electron Ionization</i> )
eV	Eletronvolt
FA	Amplitude de Fragmentação ( <i>Fragmentation Amplitude</i> )
FAB	Ionização por Bombardeamento com Átomos Rápidos ( <i>Fast Atom Bombardement</i> )
FMO	Oxidases de Função Mista ( <i>Flavin-Containing Monooxygenases</i> )
FT-ICR	Analisador de Ressonância Ciclotrónica de Iões ( <i>Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance</i> )
GSH	Glutathione



---

h	Hora
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Resolução ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
IEM	Modelo de Evaporação de Iões ( <i>Ion Evaporation Model</i> )
ISP	Proteína ferro-enxofre de Riesk ( <i>Iron-Sulfur Protein</i> ),
$k_{\text{obs}}$	Constante da velocidade da reação
kV	Quilovolt
LC-MS	Espectrometria de Massa acoplada à Cromatografia Líquida
LDMS	Espectrometria de Massa por Dessorção Laser ( <i>Laser Desorption Mass Spectrometry</i> )
LTQ-Orbitrap	Analizador Híbrido do tipo Quadrupolo de Armadilha de Iões Linear ( <i>Híbrid Orbitrap Linear Trap Quadrupole</i> )
$m/z$	Razão massa carga
MALDI	Desadsorção com Laser Assistida por Matriz ( <i>Matrix Assisted Laser Desorption</i> )
MAO	<i>Monoamina Oxidase</i>
min.	Minuto
MRM	Monitorização de Reações Múltiplas ( <i>Multiple Reaction Monitoring</i> )
MS	Espectrometria de Massa ( <i>Mass spectrometry</i> )
MS/ESI	Espectrometria de Massa com fonte de Ionização por Electrospray ( <i>Mass Spectrometry with Electrospray Ionization</i> )
MS/MS, MS <sup>n</sup>	Espectrometria de Massa em multi-estágios ou em Tandem ( <i>Tandem Mass Spectrometry</i> )
NADPH	Fosfato de Dinucleótido de Adenina e Nicotinamida
nm	Nanómetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Afinidade Protónica ( <i>Proton Affinity</i> )
PBS	Solução de tampão de fosfato ( <i>Phosphate Buffer Solution</i> )
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PQ	Primaquina
QIT	Analizador de Armadilha de Iões ( <i>Quadrupole Ion Trap Analyzer</i> )
QITMS	Espectrómetro de Massa com Analizador de Armadilha de iões ( <i>Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry</i> )

---

---

QQQ	Analisador do tipo Triplo Quadrupolo
RF	Potencial de Radiofrequência ( <i>Radio Frequency Potentials</i> )
SIM	Monitorização Seletiva de Iões ( <i>Single Ion Monitoring</i> )
SP	Potencial na Fonte ( <i>Source Potential</i> )
SRM	Monitorização de Reação Seleccionada ( <i>Selected Reaction Monitoring</i> )
$t_{1/2}$	Tempo de semi-vida
TOF	Analisador de Tempo de Voo ( <i>Time-Of-Flight Mass Spectrometer</i> )
$t_r$	Tempo de retenção
UV/VIS	Ultravioleta/Visível
V	Volt
$\lambda$	Comprimento de onda





# CAPÍTULO I

---

## Introdução



## 1.1 - Malária ou Paludismo

A malária continua a ser a doença infecciosa mais devastadora a nível mundial, com aproximadamente metade da população do mundo em risco de infeção. De acordo com o relatório da OMS (Organização Mundial da Saúde), estima-se cerca de 200 milhões de infeções reincidentes em 2013 e 600.000 mortes causadas por esta doença, atingindo maioritariamente mulheres grávidas e crianças com menos de cinco anos.[1]

A malária é prevalente em áreas tropicais, e cerca de 90% de todos os casos ocorrem em regiões endêmicas dos continentes asiático e africano (figura 1).[2, 3] A doença é causada pelo parasita protozoário unicelular do género *Plasmodium* e é transmitida ao homem através da picada de mosquitos fêmeas do género *Anopheles* infetados.[4] As cinco espécies de *Plasmodium* que afetam os seres humanos são o *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium knowlesi*. [5] O *P. falciparum* é a espécie com maior prevalência em todo o mundo, que causa a forma mais grave da doença e é responsável por mais de 95% das mortes, principalmente em África. O *P. vivax* é a segunda espécie mais comum e é responsável pela malária reincidente na Ásia e na América do Sul.[6, 7]

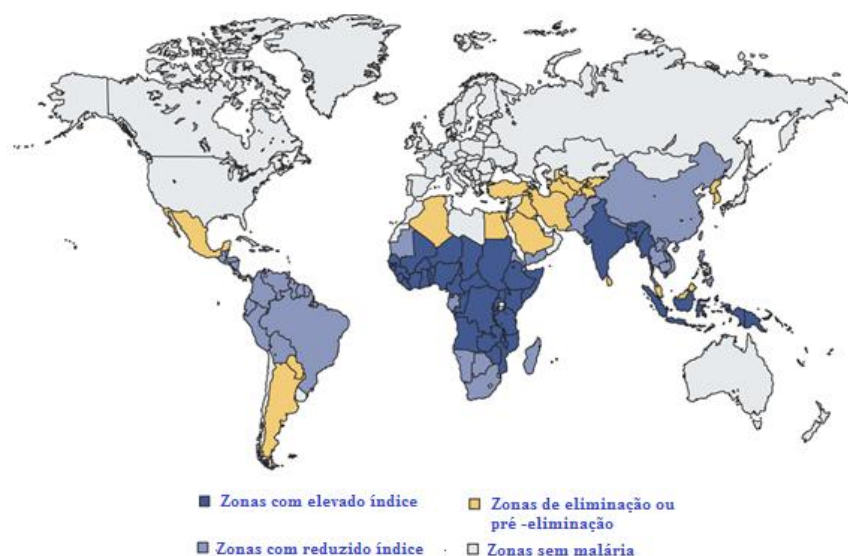


Figura 1 - Mapa representativo da distribuição da malária a nível mundial (adaptada a partir da ref. [8])

Os sinais e sintomas da doença são variáveis, sendo caracterizados por ataques de febre, na maior parte dos pacientes, acompanhados de severas dores de cabeça, arrepios, náuseas, algum delírio, dores musculares e gástricas, e nalguns casos de vômitos, diarreia e tosse.[9-11]

### 1.1.1- Ciclo de Vida do Parasita da Malária

Os parasitas da malária são organismos eucarióticos complexos cujo ciclo de vida requer dois estágios (figura 2): um que compreende o ciclo assexual (esquizogonia) no ser humano, que se desenvolve primeiro no fígado e depois nos eritrócitos circulantes e outro que descreve o ciclo sexual (esporogonia) que se desenvolve no mosquito fêmea *Anopheles*. [12]

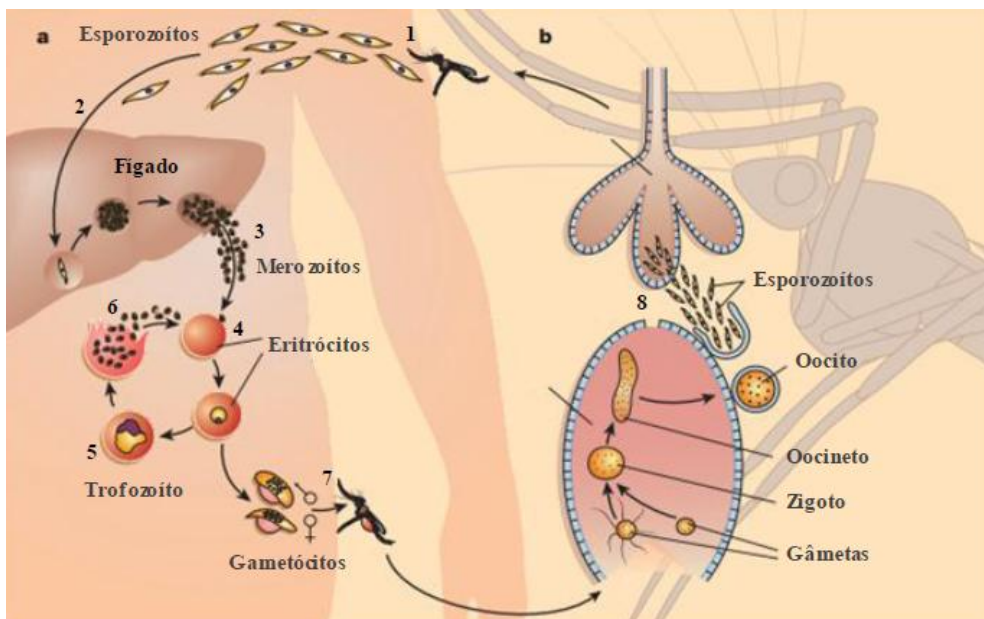


Figura 2 – Ciclo de vida dos plasmódios da malária, no homem e no mosquito (adaptada a partir da ref. [13] )

Quando a fêmea do mosquito *Anopheles* infetada perfura a pele de um ser humano, injeta o parasita que se encontra alojado nas glândulas salivares, sob a forma de esporozoítos (1) (figura 2). Estes são transportados até ao fígado do hospedeiro humano, através da corrente sanguínea (2), onde se desenvolvem em esquizontes hepáticos ou formas exoeritrocíticas através de um processo chamado esquizogonia, que origina os



merozoítos (3). Os merozoítos são libertados na corrente sanguínea, onde invadem os eritrócitos do hospedeiro, sofrendo modificações morfológicas até à formação de trofozoítos que evoluem para esquizontes. A libertação de merozoítos para a corrente sanguínea marca o início da fase eritrocítica da infeção (4-6), durante a qual os parasitas infetam os glóbulos vermelhos, são submetidos a ciclos repetidos de replicação assexuada, e originam a doença clínica. Alguns merozoítos diferenciam-se em gametócitos que podem ser ingeridos pelo mosquito através de uma picada no hospedeiro infetado (7). No mosquito, os gametócitos submetem-se a um desenvolvimento sexual, durante o qual os gâmetas se fundem para formar um zigoto, originando um oocineto móvel, que migra para a parede exterior do estômago, onde se forma o oocisto. Quando o oocisto se rompe, liberta os esporozoítos, que migram para as glândulas salivares (8) e que podem infetar outro hospedeiro através de outra picada.[14, 15]

No *P. vivax* e no *P. ovale*, nem todos os esporozoítos se desenvolvem, imediatamente, em esquizontes. Alguns permanecem, nas células hepáticas, no seu estado latente por longos períodos de tempo. Caso as formas dormentes (hipnozoítos) não sejam destruídas no fígado por fármacos antimaláricos específicos, o seu desenvolvimento, à posterior, é responsável pelo aparecimento da doença. O *P. falciparum*, normalmente não produz hipnozoítos, mas pode, após um ano, ocorrer a recrudescência, como resultado da sobrevivência da forma eritrocítica do parasita.[16]

### 1.1.2 - Fármacos Antimaláricos

Tradicionalmente, os compostos antimaláricos (figura 3) são classificados de acordo com a fase do ciclo de vida do parasita sobre a qual exercem atividade, ou de acordo com o seu mecanismo de ação, em: *i*) esquizontocidas sanguíneos ou agentes supressores, se atuarem nas formas assexuadas eritrocíticas das espécies *Plasmodium*; (cloroquina 1, a quinina 2, a lumefantrina 3, a pirimetamina 4, mefloquina 5, a sulfadoxina 6 e sulfonas, a artemisina 7 e seus derivados, a atovaquona 10 e amodiaquina 11); *ii*) esquizontocidas tecidulares primários ou fármacos profiláticos causais, quando exercem atividade sobre as formas parasitárias pré-eritrocíticas; (pirimetamina 4, a primaquina 8, sulfadoxina 6 e o proguanilo 9); *iii*) esquizontocidas

tecidulares secundários se atuam sobre as formas parasitárias exo-eritrocíticas latentes das espécies *P. vivax* e *P. malariae* evitando os casos de recaídas (primaquina **8**) e iv) gametocitocidas, cuja ação recai sobre as formas sexuadas do parasita. A cloroquina **1** e a quinina **2** exibem atividade gametocitocida contra o *P. vivax* e *P. Malariae*, mas não contra o *P. falciparum*. A primaquina **8** (PQ) exerce esta atividade contra todo o tipo de plasmódio, incluindo o *falciparum*; v) esporontocidas, quando inibem o desenvolvimento das formas esporogênicas no mosquito evitando a transmissão da doença ao hospedeiro humano (cloroquina **1** e primaquina **8**).[16]

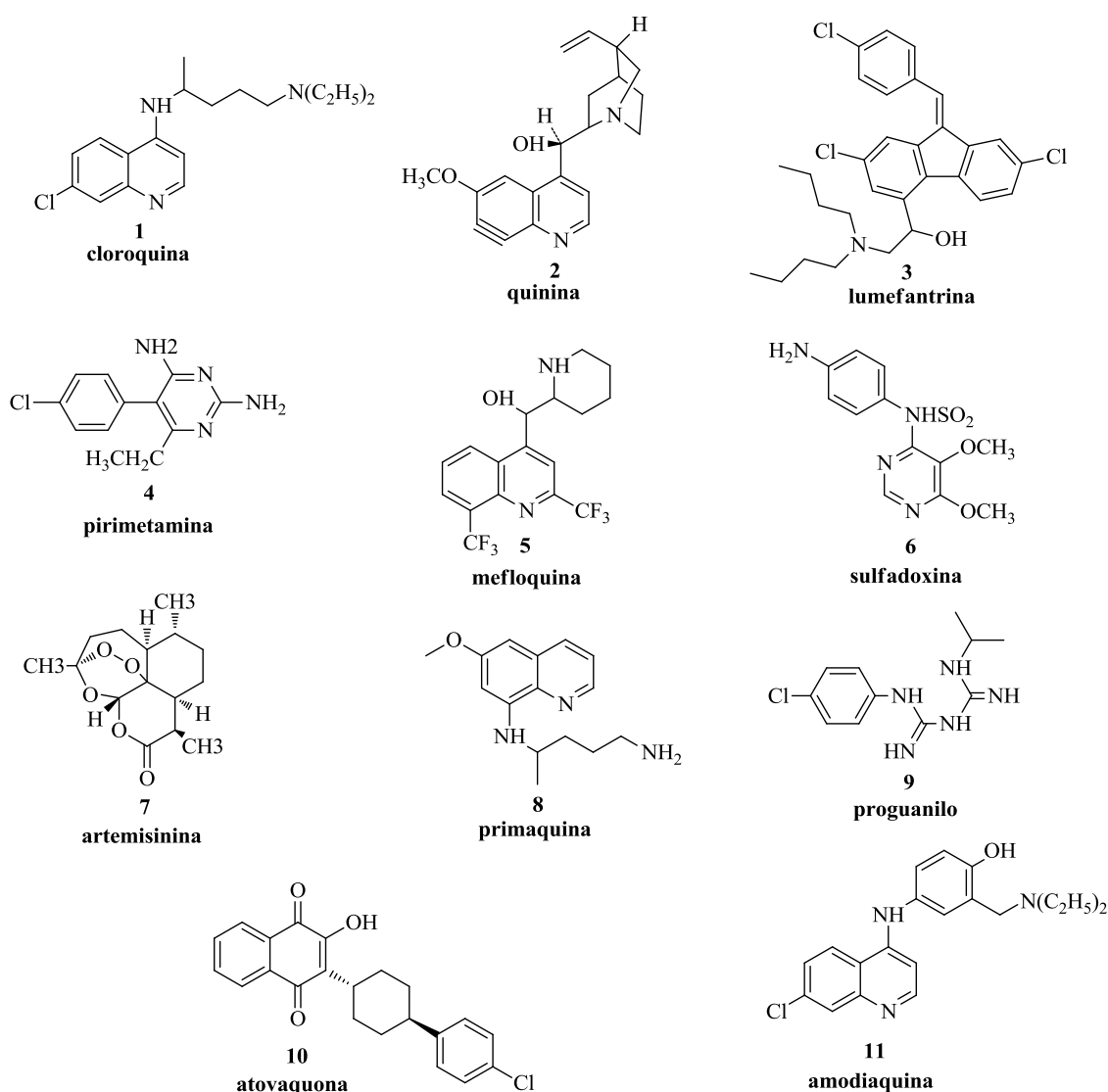


Figura 3 – Estrutura química de alguns fármacos antimaláricos

O arsenal limitado de estratégias de intervenção disponíveis para travar a expansão da malária, nomeadamente: a erradicação dos insetos vetores, a promoção de

ações preventivas que visam a redução do contacto entre os homens e mosquitos e a inexistência de uma vacina eficaz; têm contribuído significativamente para a proliferação da resistência dos parasitas aos fármacos existentes.[17-19]

As estratégias importantes, para retardar ou superar a resistência clínica, consistem no desenvolvimento de novas moléculas químicas estruturalmente diversificadas e eficazes, quer para o tratamento como para a profilaxia, e que atuem por mecanismos distintos e sobre diferentes alvos terapêuticos.[18-22]

A atovaquona **10**, uma hidroxinaftoquinona inibidora do complexo bc1 (figura 4) atinge, com elevada seletividade, o local de oxidação do ubiquinol ( $Q_0$ ) do citocromo b, nas proximidades do local de interação com a proteína ferro-enxofre de Riesk (ISP - *iron-sulfur protein*), que desempenha um papel importante para a transferência dos eletrões para o citocromo c.

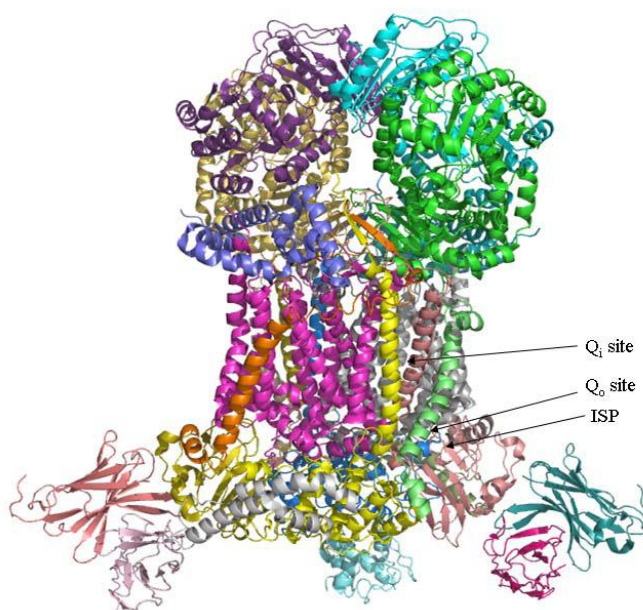


Figura 4 – Estrutura do Complexo bc1 (adaptada a partir da ref. [23])

A comprovação da eficácia da atovaquona **10** em combinação com o proguanilo **9**, na inibição da função mitocondrial do parasita bem como as recentes descobertas de 4-piridonas capazes de retardar ou superar a resistência clínica, confirmam que a cadeia mitocondrial de transporte de eletrões (figura 5) é uma estratégia quimioterápica bem-sucedida e válida.[21, 24-26]

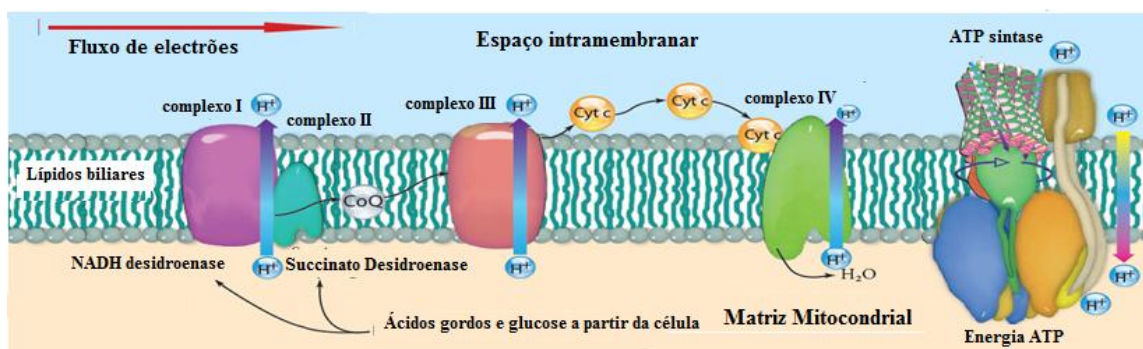


Figura 5 – Cadeia de transporte de eletrões na membrana mitocondrial dos parasitas *Plasmodium* (adaptada e consultada em [www.towardsoneworld.eu](http://www.towardsoneworld.eu))

A ART **7** na figura 3 e respetivos análogos di-hidroartemisinina DHA **7a**, artesunato **7b**, artemeter ARM **7c**, arteeter AE **7d** e ácido artelínico **7e** apresentados na figura 6 representam um grande avanço na quimioterapia da malária, dada a rápida resposta terapêutica que produzem particularmente em estirpes do *P. falciparum* multi-resistentes.[27] Estes compostos revelaram-se bastante eficazes contra as formas parasitárias assexuadas, evitando o desenvolvimento precoce dos gametócitos e consequentemente, bloqueando a transmissão da doença.

Apesar de até ao momento não existirem evidências clínicas relevantes de resistência do plasmódio às artemisininas, foi verificada uma diminuição da suscetibilidade dos parasitas ao tratamento com artemisininas na fronteira entre a Tailândia e o Camboja, demonstrando o possível desenvolvimento de parasitas resistentes ao fármaco. As principais razões para o aparecimento deste fenómeno de resistência às artemisininas são, provavelmente, devidas: *i*) ao uso de monoterapia; *ii*) às doses subterapêuticas administradas e ou *iii*) à falsificação deste produto no mercado.[28, 29]

Com base nestas constatações e com o objetivo de evitar a recrudescência e o desenvolvimento de estirpes resistentes do *Plasmodium falciparum*, a OMS recomenda, como principal estratégia de tratamento, a terapia combinada na administração de artemisininas ACT - (*Artemisin Combined Therapy*.)

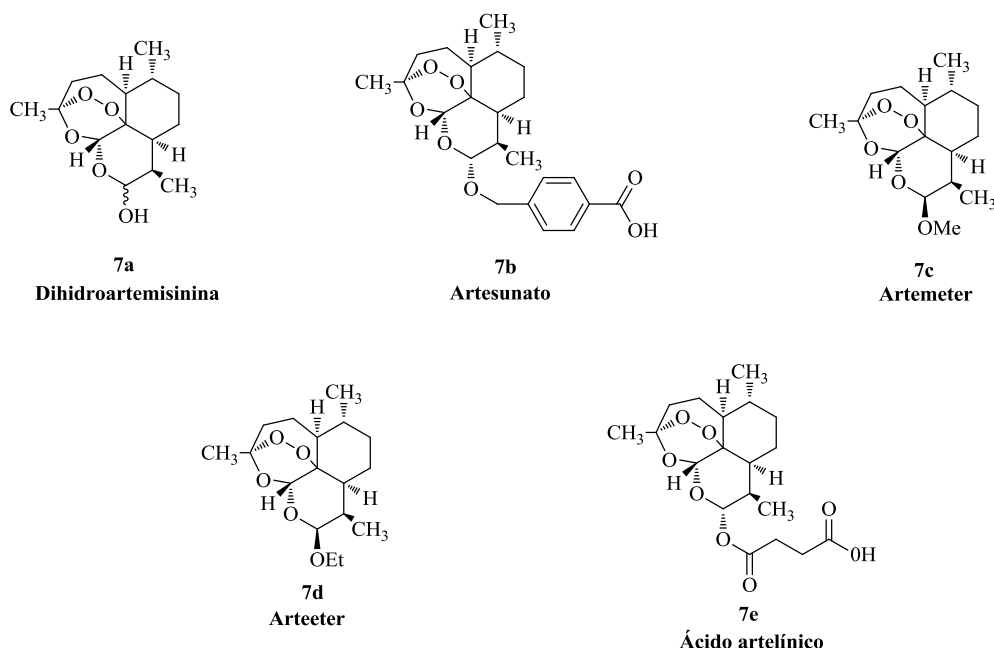


Figura 6 – Derivados semi-sintéticos da artemisinina

Esta abordagem tem como fundamento a combinação de derivados da artemisinina, ART 7, que têm rápida ação sobre o parasita mas são rapidamente excretados, com outro fármaco antimalárico, que tenha maior tempo de semi-vida, com capacidade para eliminar os parasitas que possam escapar a ação da ART e prevenir o reaparecimento da doença, situação frequentemente detectada nos indivíduos infetados sujeitos à monoterapia de ART. De facto, as combinações entre a ART ou derivados e fármacos como a mefloquina **5** ou lumefantrina (**3**), ilustrados na figura 3, têm-se revelado altamente eficazes, mesmo no tratamento de estirpes de *Plasmodium* multi-resistente.[30-33]

Uma das estratégias utilizadas, como alternativa para as ACT tem sido o desenvolvimento de moléculas híbridas, ou seja, de moléculas que resultam da ligação covalente de dois ou mais agentes antimaláricos, numa única entidade química, visando cada uma, uma fase específica do ciclo de vida do parasita.[31, 34-36]

Algumas das moléculas híbridas já desenvolvidas, revelaram-se eficazes e apresentaram resultados promissores contra os respetivos alvos de ação no parasita. Constituem exemplos, a síntese de compostos híbridos à base da primaquina e artemisinina (PQ-ART) que combinam endoperóxidos, 1,2,4,5-tetraoxanos e farmacóforos derivados das 8-aminoquinolinas (8-AQ) e que demonstraram a capacidade dessas moléculas para bloquear a transmissão do parasita e eliminar as

formas hepáticas assintomáticas e latentes.[34, 37]

### 1.1.2.1 – Compostos que Atuam na Fase Hepática: 8-Aminoquinolinas

De entre os inúmeros compostos que fazem parte desta classe de antimaláricos, a pamaquina **12** (figura 7) destacou-se ao revelar-se ativa contra os gametócitos do parasita e com capacidade para bloquear a transmissão e prevenir o reaparecimento da doença em indivíduos infetados com *P. vivax*. O seu uso terapêutico, foi abandonado por estar associado à inúmeras desvantagens, relacionadas com: *i*) a reduzida eficácia como esquizontocida sanguíneo em terapia profilática; *ii*) a incapacidade de prevenir as recidivas do *P. vivax*, ainda que administrada em terapia combinada com a quinina e *iii*) apresentar elevada toxicidade, provocando a hemólise e a metahemoglobinémia.[38-41]

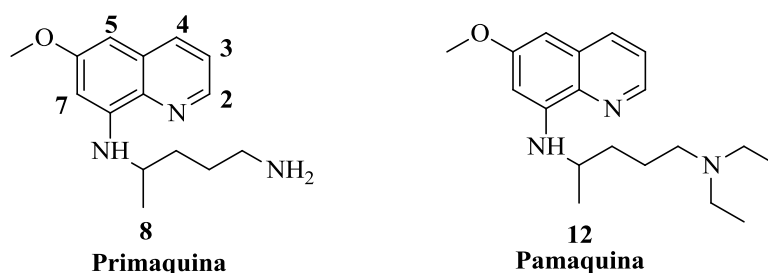


Figura 7 – Estrutura da primaquina 8 e da pamaquina 12

Na tentativa de ultrapassar essas limitações, foram sintetizadas outras 8-aminoquinolinas (8-AQ) que apresentam melhor índice terapêutico.[38, 42] De entre elas destaca-se a primaquina **8 (PQ)**, o único fármaco antimalárico clinicamente disponível, que exibe elevada atividade gametocitocida contra todas as espécies de malária humana, incluindo as estirpes multi-resistentes do *P. falciparum*. Atua ainda como esquizontocida tecidular capaz de eliminar as formas primárias e secundárias hepáticas e é o único fármaco que cura totalmente a malária recorrente em indivíduos infetados com os *P. vivax* e *P. ovale*, pois consegue eliminar os hipnozoítos.[43, 44]

A PQ é frequentemente associada aos efeitos secundários graves e indesejáveis, causados pelos seus metabolitos tóxicos. A toxicidade da PQ é ainda maior em pessoas deficientes de glicose-6-fosfato desidrogenase - G6PD), ou glutathione sintetase - GSH, pois nestas condições não só causa a anemia hemolítica, como também conduz à

redução da biodisponibilidade oral devido à sua extensiva conversão em carboxiprimaquina (CPQ) **13** (figura 8) inativa, resultante da desaminação oxidativa do fármaco.[43, 45] A baixa biodisponibilidade oral condiciona a administração da primaquina em repetidas e elevadas doses (15mg/dia durante 14 dias), podendo sob estas condições potenciar o aparecimento dos efeitos secundários nefastos.[46]

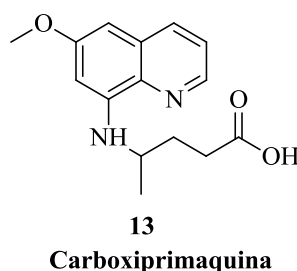


Figura 8 – Estrutura da carboxiprimaquina 13

Apesar da primaquina **8** ser uma quinolina, o seu modo de ação parece ser completamente distinto do das 4-aminoquinolinas, como a cloroquina, cujo modo de ação, está relacionado com a acumulação no vacúolo digestivo ácido e a ligação ao grupo heme, impedindo a sua destoxificação. [47, 48] O mecanismo exato pelo qual a primaquina consegue exercer a sua atividade antimalárica ainda continua incerto, mas presume-se que seja por eventual interferência com a função da ubiquinona na cadeia eletrónica mitocondrial ou por produção de metabolitos reativos que geram espécies intracelulares oxidativas bastante potentes.[41, 43, 44] Deste modo, o mecanismo de ação da primaquina pode estar relacionado com a ação das naftoquinonas, como a atovaquona, que inibe o complexo bc1 existente na cadeia respiratória e colapsa o potencial da membrana mitocondrial. [25]

Com o objetivo de aumentar a atividade antimalárica da primaquina **8** e reduzir a sua toxicidade, foram ao longo do tempo desenvolvidos análogos, resultantes de alterações estruturais efetuadas no núcleo quinolínico, através da introdução de grupos substituintes nas posições 2, 3, 4, 5 e 7 do anel quinolínico e na cadeia lateral (figura 7). [49] Muitos deles exibiram atividade, contra os *P. vivax* e *falciparum*, igual ou superior à da primaquina **8**. Como exemplo podem ser referidos os derivados das 4-imidazolidinonas **14** e a ablaquina ou bulaquina **15** resultantes da modificação da amina primária terminal e a tafenoquina **16**, com grupos substituintes no anel quinolínico (figura 9). Estes dois últimos compostos, completaram os ensaios clínicos de Fase II/III.

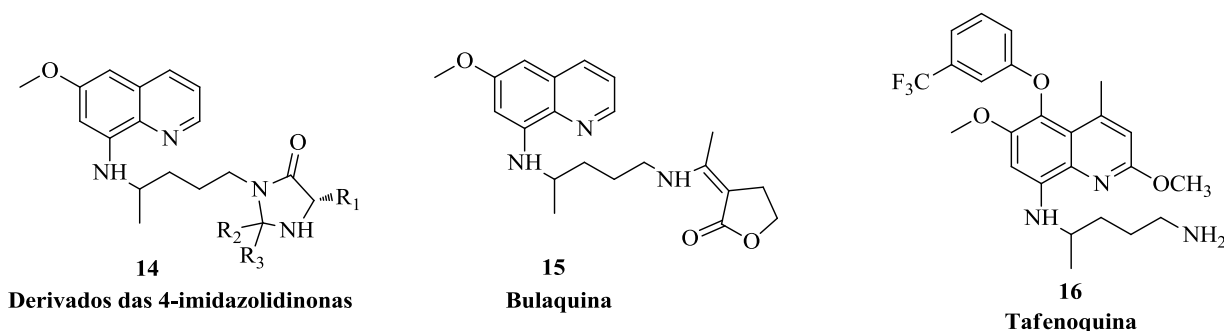


Figura 9 – Derivados da primaquina

A bulaquina **15** é atualmente comercializada na Índia (Aablaquine™) para uso clínico contra a malária *vivax* e a tafenoquina **16** encontra-se atualmente na fase final de desenvolvimento como um agente antimalárico profilático.[41, 49-52]

### 1.1.2.2 – Compostos que Atuam na Fase Sanguínea

#### 1.1.2.2.1 - Endoperóxidos Sintéticos

A descoberta das propriedades antimaláricas da ART 7 (figura 3), princípio ativo da *Artemísia annua*, e o desenvolvimento de derivados semi-sintéticos, ilustrados na figura 6 constituíram um grande avanço na quimioterapia da malária. Estes compostos apresentam inúmeras vantagens quando comparados com outros agentes antimaláricos, devido a uma rápida resposta terapêutica contra os parasitas multi-resistentes da malária, ausência de evidências clínicas significativas de estripes resistentes apesar de terem um uso clínico difundido e pouca ou nenhuma resistência cruzada com outros compostos antimaláricos.[53]

Uma das maiores desvantagens associada à artemisinina e aos seus derivados semi-sintéticos é o perfil farmacocinético traduzido pelo tempo de semi-vida ( $t_{1/2}$ ) bastante reduzido (3-5h) que geralmente pode promover o reaparecimento da infecção.[54] Alguns estudos apontam para os potenciais efeitos tóxicos, destes compostos, condicionados pela sua lipofilia e pela sua capacidade de atravessar as barreiras hematoencefálica e placentária.

De modo a obviar os problemas relacionados com as desvantagens associadas à artemisinina e aos seus derivados foram desenvolvidos inúmeros análogos peroxídicos, nomeadamente os 1,2,4-trioxanos **17** (figura 10), 1,2,4-trioxolanos, e 1,2,4,5-



tetraoxanos, tendo em conta a estrutura endoperoxídica, fundamental para a atividade antimalárica.[55-57]. De entre os compostos mais promissores que emergiram destacam-se os ozonidos, moléculas a partir das quais foi desenvolvido o candidato trioxolano OZ277 **18** (figura 10), primeiro endoperoxídeo antimalárico introduzido em ensaios clínicos que apresentou excelente atividade antimalária *in vitro*, mas reduzida estabilidade no plasma.[58]

O estudo efetuado com o objetivo de comparar a estabilidade reacional de um tetraoxano selecionado para ensaios clínicos, o RKA 182 **19**, (figura 10) com um trioxolano, através da exposição de ambos a um meio com eritrócitos infetados, mostrou que os trioxolanos degradam-se mais rapidamente no meio do que o RKA 182. Estes dados indicam que os derivados tetraoxanos apresentam, comparativamente aos trioxalanos não só maior estabilidade no plasma, como também, uma atividade esquizontocida sanguínea superior, constituindo deste modo, uma alternativa totalmente sintética e de baixo custo aos derivados da artemisinina.[33, 58]

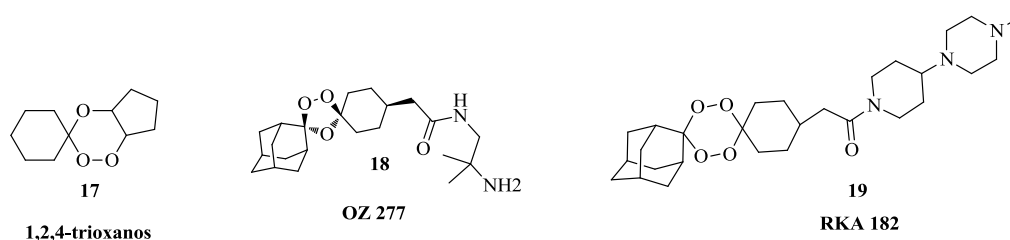


Figura 10 – Derivados endoperoxídeos sintéticos da ART

Tal como as artemisininas, estes derivados são ativados, por redução, pelo  $\text{Fe}^{2+}$  e exercem o seu modo de ação através da formação de espécies radiculares capazes de alquilar vários alvos no parasita, levando à sua morte.[16, 59, 60]

Apesar destes compostos serem capazes de eliminar rapidamente as formas sanguíneas dos parasitas da malária, os mesmos revelam-se inativos na fase hepática da doença.[53]

#### 1.1.2.2.2 - Piridonas

Apesar da eficácia da atovaquona **10**, rapidamente surgiram estirpes resistentes após a sua introdução na terapia clínica. O contínuo interesse pelo desenvolvimento de

novos inibidores do transporte eletrônico mitocondrial do parasita como potenciais antimaláricos conduziu à descoberta do clopidol **20** (figura 11). O composto **20** demonstrou possuir atividade antimalárica contra as estirpes do *P. falciparum* resistentes à cloroquina.[61, 62] Para além da ação anticoccidial também exibiu atividade contra as estirpes resistentes à atovaquona, sugerindo que os derivados das piridonas podem ligar-se a um local diferente do da atovaquona no local Qo (figura 4) do complexo bc1 inibindo deste modo a respiração mitocondrial.[61-64]

A baixa solubilidade apresentada pelos derivados das piridonas em vários solventes conduziu à síntese de vários análogos, com perfil farmacocinético e propriedades físico-químicas melhoradas através de algumas transformações químicas no anel da piridona.[65, 66]

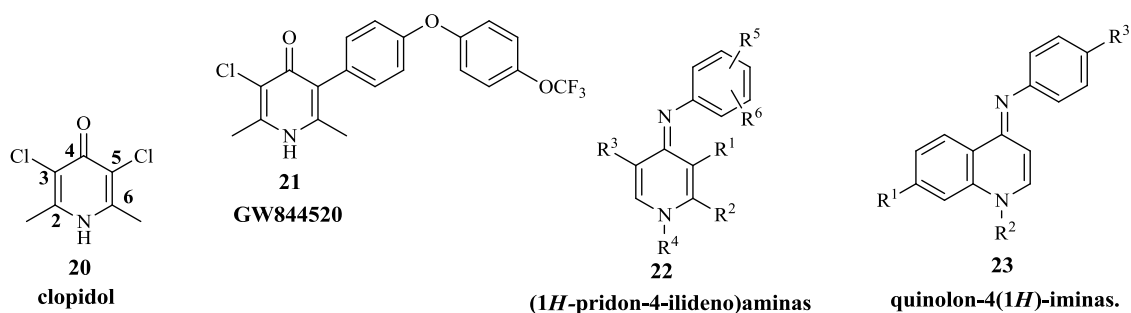


Figura 11 – Estrutura química dos derivados das piridonas

Julga-se que a posição C5 do anel da piridona (ver **20** na figura 11) esteja próxima de um canal hidrofóbico do citocromo que contém aminoácidos com cadeias laterais aromáticas e alifáticas. Desta forma, a introdução de cadeias lipofílicas ou cadeias laterais, na posição C5 do anel da piridona, que é menos propensa ao metabolismo, como é o caso de substituintes trans-(4-clorofenilo) ciclohexilo, cadeia lateral da atovaquona **10** (figura 3), é bem tolerada e permite obter compostos com maior atividade antimalárica. O aumento da atividade antimalárica também foi notório em análogos, com substituintes biarilo ou 4-fenoxiarilo, como é o caso do composto **21** (figura 11).[61, 65, 67]

Foi também demonstrado que o clopidol **20** pode potenciar a actividade antimalárica das hidroxinaftoquinonas, *in vitro* e *in vivo* e manter a actividade contra as estirpes resistentes à atovaquona. Esta observação suscitou a hipótese do clopidol poder atuar por um mecanismo novo uma vez que a simplicidade da sua estrutura oferece

claramente algumas possibilidades de manipulação para melhorar a atividade antimalárica.[67]

Os estudos de modelação molecular sugerem que (1*H*-piridin-4-ilideno) aminas **22** (figura 11), contendo uma cadeia lateral lipofílica no átomo de azoto da imina, sintetizadas como potenciais isósteros de **20**, podem ligar-se ao local Qo de oxidação do ubiquinol no complexo bc1 (figura 4). A otimização da atividade destes compostos foi também favorecida pela adição de um anel aromático, o que conduziu à síntese das quinolon-4(1*H*)-iminas **23** (figura 11) que também possuem os requisitos estruturais adequados para interagir no complexo bc1.[68]

## 1.2 - Espectrometria de Massa

A espectrometria de massa (MS) é uma técnica analítica muito frequentemente aplicada não só na identificação e elucidação estrutural dos compostos, como também na determinação de propriedades termodinâmicas e físicas tais como a energia de ionização, energia de aparecimento, a entalpia de uma reação, a afinidade protônica e iônica, entre outras.[69, 70]

Várias áreas de conhecimento têm beneficiado com esta técnica instrumental, versátil, abrangente e de elevada precisão e sensibilidade.

### 1.2.1 - Princípios Básicos

O princípio de espectrometria de massa baseia-se na formação de iões, em fase gasosa, (carregados positiva ou negativamente), a partir de compostos inorgânicos ou orgânicos, quer sejam pequenas moléculas ou macromoléculas biológicas, que são à posterior isolados com base na sua razão massa/carga ( $m/z$ ) e detetados em função da sua abundância.[71]

Este processo pode ser elucidado através de três etapas: [69]:

1. A 1ª etapa é a da ionização, que converte os átomos ou as moléculas do analito, na fase gasosa, em espécies iónicas. Requer por isso a remoção ou a adição de um eletrão ou protão. A energia excedente durante a ionização pode causar a cisão da molécula em fragmentos característicos (figura 12);

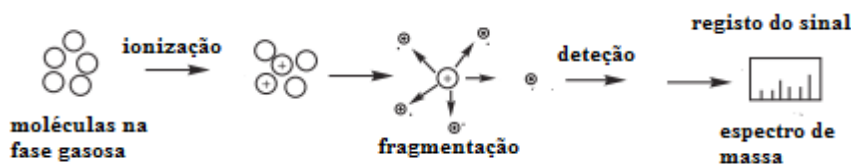


Figura 12 – Mecanismo de conversão de moléculas na fase gasosa em espécies iónicas  
(adaptada a partir da ref.[69])

2. A 2ª etapa é a da separação e análise das massas dos iões produto gerados com base nos seus valores de  $m/z$ ;
3. Por fim, ocorre a medição da corrente dos iões separados, a amplificação do

sinal e o seu registo sob a forma de um espectro de massa

As etapas de separação e deteção decorrem sob elevado vácuo, o que possibilita a livre circulação dos iões no seu percurso, até atingirem o detector, sem colidirem/interagirem entre si ou com outras espécies. As colisões podem levar à fragmentação dos iões e também podem produzir diferentes espécies resultantes de interações entre iões e moléculas. Estes processos contribuem para a diminuição da sensibilidade, para o aumento da ambiguidade nas medições e para a diminuição da resolução.[69, 72]

Existem diversos tipos de espectrómetros de massas, com distintas vantagens e limitações. Porém, todos apresentam componentes básicos comuns, tais como: o sistema de introdução da amostra, a fonte de ionização, o analisador de massas, o detector e o sistema de controlo e aquisição de dados. (figura 13).

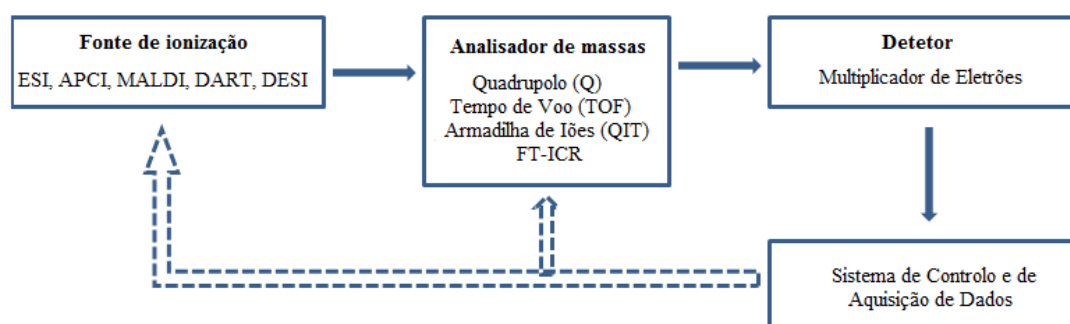


Figura 13 – Componentes básicos de um espectrómetro de massa (adaptada a partir da ref. [71])

*ESI-Ionização por Electrospray, APCI – Ionização Química à Pressão Atmosférica, MALDI-Dessorção por Laser Assistida por Matriz, DART- Análise Direta em Tempo Real, DESI-Dessorção por Ionização por Electrospray, FT-ICR – Analisador de Ressonância Ciclotrónica.*

A disponibilidade de fontes de ionização bem como de analisadores faz com que a escolha do equipamento mais adequado a uma aplicação tenha de ser bem avaliada.

A ionização pode ocorrer tanto no modo positivo quanto no negativo, dependendo das características do analito de interesse e, em geral, ocorre de uma das seguintes formas: *i)* ejeção ou captura de eletrões, formando espécies conhecidas como ião molecular ( $M^+$  ou  $M^-$ ); ou *ii)* adição ou remoção de um ião  $H^+$  (protonação ou desprotonação), levando a formação de moléculas protonadas  $[M+H]^+$ , desprotonadas

$[M-H]^-$  e ou de iões de moléculas catiónicas  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$  e ou aniónicas  $[M+Cl]^-$ .

As técnicas usadas para a indução da formação de iões, permitem a realização de processos de ionização diferentes. Nos métodos de ionização ditos “duros”, os iões gerados apresentam um grande conteúdo de energia residual interna. Estes iões tendem a decompor-se em iões produto de  $m/z$  menores. Consequentemente, os espectros de massas obtidos apresentam um grande número de iões produto, o que é de grande interesse do ponto de vista da elucidação estrutural, uma vez que estes são indicativos da estrutura do ião precursor e, portanto, da estrutura do analito. O método de ionização dito “duro” mais comum é a ionização eletrônica (EI - *Electron Ionization*) e é mais adequado para a análise de moléculas voláteis e de baixo peso molecular.[73]

Os métodos de ionização ditos “brandos”, como o bombardeamento com átomos rápidos (FAB), a ionização através da matriz de dessorção assistida por laser (MALDI – *Matrix Assisted Laser Desorption*) e a ionização por electrospray (ESI – *Electrospray Ionization*) permitem a deteção de moléculas protonadas, desprotonadas e ou de moléculas catiónicas/aniónicas e são mais adequados para a análise de substâncias termolábeis e de peso molecular elevado.[71, 74] Nestes métodos, uma pequena quantidade de energia é transferida para a amostra, o que resulta em iões com energia residual interna relativamente baixa. Consequentemente, os espectros de massas obtidos caracterizam-se pela presença de iões precursores relativamente intensos e com poucos iões produto, possibilitando deste modo a determinação da massa molecular mas, proporcionando pouca ou nenhuma informação estrutural.[71]

Os analisadores de massas, responsáveis pela separação ou resolução dos iões de acordo com a razão  $m/z$ , são disponibilizados em função da gama de resolução de massas, da precisão, sensibilidade, da compatibilidade com a interface ou com o sistema de ionização empregue e apresentam diferentes custos associados. São exemplos de analisadores de massas, o analisador de armadilha de iões (Ion Trap - ITQ), o de triplo Quadrupolo QQQ, o de Setor (elétrico e magnético), o de Tempo de Voo (TOF), o de Ressonância Ciclotrónica de Iões com Transformada de Fourier (FT-ICR - *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*) e o Orbitrap, entre outros.

Os sistemas de deteção são responsáveis pela quantificação dos iões separados e pela sua conversão em sinais elétricos.

Neste trabalho, serão abordados, com detalhe, o método de ionização por *electrospray* e o analisador do tipo triplo quadrupolo (QQQ) em virtude dos mesmos

terem sido empregues na parte do trabalho experimental efetuado. Também é feita uma breve referência ao analisador de armadilha de iões (QIT), uma vez que algumas experiências foram conduzidas neste equipamento com o objetivo de comparar o comportamento dos derivados das quinolon- 4(1*H*)-iminas nestes dois analisadores.

### **1.2.2 - Técnicas de Ionização: Ionização por Electrospray (ESI)**

O conceito de ionização por electrospray (ESI - *Electrospray Ionization*) foi proposto inicialmente por Dole em 1968. No entanto, as suas experiências não foram convincentes, pois estas visavam a análise de espécies poliméricas, como poliestireno, que não são ionizados em solução.[75]

A partir do trabalho desenvolvido por Yamashita e Fenn em 1984, a técnica sofreu um grande avanço por possibilitar a ionização de proteínas, permitindo deste modo a determinação das suas massas molares. Posteriormente, a espectrometria de massa com fonte de ESI foi aplicada não só na análise de outras biomoléculas e polímeros como também na análise de pequenas moléculas polares (fármacos e metabolitos) revelando-se uma técnica sensível e facilmente acoplável a técnicas cromatográficas. Fenn recebeu, em 2002, o prémio Nobel de Química pelo desenvolvimento da fonte de ESI para análise de macromoléculas biológicas.[76]

Desde o seu surgimento, a ESI tornou-se uma das técnicas analíticas mais poderosas e amplamente utilizadas. As vantagens da ESI incluem a alta sensibilidade, a facilidade de uso e o consumo reduzido de amostra, para além da análise de uma ampla variedade de moléculas, incluindo proteínas, ácidos nucleicos, e até mesmo complexos metálicos, desde que sejam ionizáveis.

Há essencialmente três características que fazem com que a ESI seja considerada uma técnica distinta das outras técnicas de ionização. A primeira destas características é a capacidade para produzir iões de carga múltipla, reduzindo assim a razão  $m/z$  e possibilitando a análise de compostos de elevada massa molecular. A segunda característica é que as amostras a serem analisadas são introduzidas em solução, o que faz com que seja possível o acoplamento com muitas técnicas de separação. Por último, a ionização por electrospray é uma técnica de ionização branda, provocando pouca ou quase nenhuma fragmentação dos analitos estudados.

A produção de iões requer, essencialmente, dois passos: dispersão de gotas altamente carregadas, à pressão atmosférica, seguida por condições que permitam a evaporação do solvente. A gota é formada na ponta de um capilar, que se encontra a determinado potencial (2 a 5kV), originando iões positivos ou negativos.[77] Os iões formados são solvatados com as moléculas do solvente. O gás de ar quente ou seco, designado como gás de dessolvatação, normalmente o nitrogénio, vai provocar a evaporação do solvente. O processo de evaporação reduz o tamanho das gotículas aumentando consequentemente a densidade da carga na superfície da gota e no seu interior.[77, 78] O campo elétrico formado entre o capilar e o contra-eléctrodo aumenta, provocando uma deformação na gota.[79] A gota ganha forma de um cone, o qual é denominado de cone de Taylor [80, 81]. Quando a densidade da carga supera a tensão superficial, a gota desprende-se do capilar subdividindo-se, num processo conhecido como explosão de Coulomb (figura 14). A densidade máxima de carga que uma gotícula pode apresentar é conhecida como limite de Rayleigh.[82]

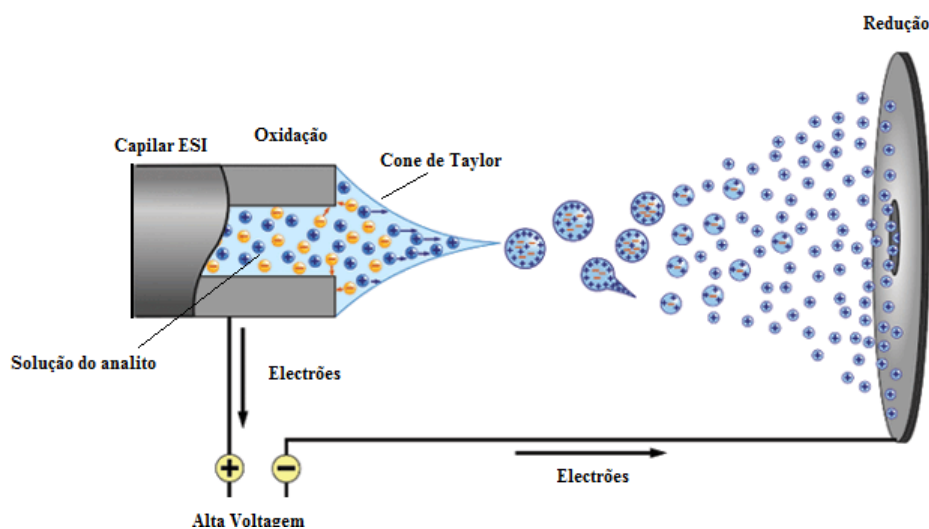


Figura 14 - Representação esquemática de uma fonte ESI a operar em modo positivo  
(consultada em [www.waters.com](http://www.waters.com))

Não se sabe exatamente como é que o ião é gerado na fase gasosa. Existem duas teorias principais, conforme elucidado na figura 15, para explicar a produção de iões na fase gasosa: o modelo proposto, por Dole *et al*, em 1968, denominado por Modelo de Carga Residual (CRM - *Charged Residue Model*) e o Modelo da Evaporação de Iões (IEM - *Ion Evaporation Model*), proposto por Thomson e Iribarne.[75, 83]



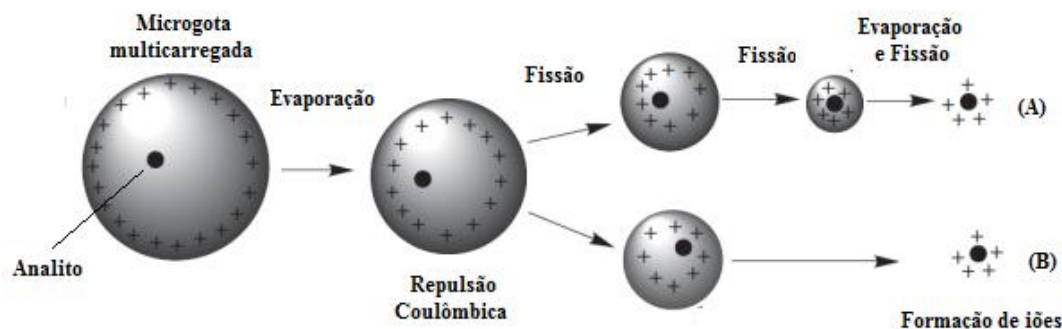


Figura 15 - Representação esquemática dos possíveis mecanismos para a formação de íons na fase gasosa (A) CRM e (B) IEM (adaptada a partir da ref. [69])

Qualquer um dos mecanismos tem início com a formação de um aerossol de gotículas altamente carregadas. A diferença fundamental entre os dois modelos (CRM e IEM) (figura 15) reside na maneira como a molécula de analito se separa de outras moléculas do soluto contidas na gota.[84]

Dole *et al.* propuseram no modelo CRM, que as gotículas geradas por electrospray passam por ciclos de evaporação e fissão que levam à formação de gotículas tão pequenas que cada uma delas contém somente uma molécula do analito. A formação de íons na fase gasosa ocorre à medida que as moléculas do solvente se evaporam deixando o analito com as cargas que a gotícula inicial carrega. A evaporação do solvente leva a um aumento de carga na gota até atingir o limite de Rayleigh. Como consequência da ocorrência da explosão de Coulomb, são geradas gotículas menores, que continuam a evaporar e a desintegrar-se.[74, 85, 86]

Iribarne e Thomson sugerem que a emissão dos íons ocorre diretamente de gotas muito pequenas e altamente carregadas. O aumento da densidade de carga na sua superfície é tão elevado que o campo elétrico superficial resultante seria suficientemente intenso para provocar a passagem de um ou mais desses íons superficiais para a fase gasosa. Dessa forma, seriam formados íons em fase gasosa de, pelo menos, algumas moléculas de soluto. A contínua evaporação do solvente a partir de gerações sucessivas dessas gotas carregadas, iria resultar na passagem de uma parte ou de todos esses cátions ou aniões da superfície dessas gotas originais para a fase gasosa.[86]

A principal diferença entre estes dois modelos é que o íão final no modelo IEM é produzido por dessorção, ao passo que o íão no modelo CRM é produzido por evaporação do solvente que constitui a gota.[87]

Com base nos resultados das suas experiências pioneiras com poli(etileno)glicóis, cationizados Fenn e Nohmi concluíram que apenas iões maiores do que 5 MDa são formados pelo método CRM, e que os iões mais pequenos são formados por IEM.[75, 85, 87]

## **1.2.3 – Analisadores de Massa**

### **1.2.3.1 - Analisadores de Massa do Tipo Quadrupolo**

O quadrupolo é o analisador mais utilizado devido à sua robustez, facilidade de manipulação e reduzido preço de aquisição. Apresenta também boa linearidade numa gama larga de concentrações para análises quantitativas.

Os analisadores do tipo quadrupolo, esquematicamente representados na figura 16, utilizam campos elétricos oscilantes, gerados por quatro barras metálicas (quatro pólos, dois negativos e dois positivos), dispostos alternadamente. A secção dos quatro pólos é circular (idealmente hiperbólica).[88]

Os potenciais de corrente direta (DC – *direct current*) e de radiofrequência (RF) aplicados vão gerar um campo eletromagnético responsável pela trajetória dos iões, através de variações sistemáticas dos seus valores, sugerindo deste modo que o quadrupolo funciona como um filtro, que vai permitir a diferenciação dos iões que chegam ao detector com diferentes valores de  $m/z$ .

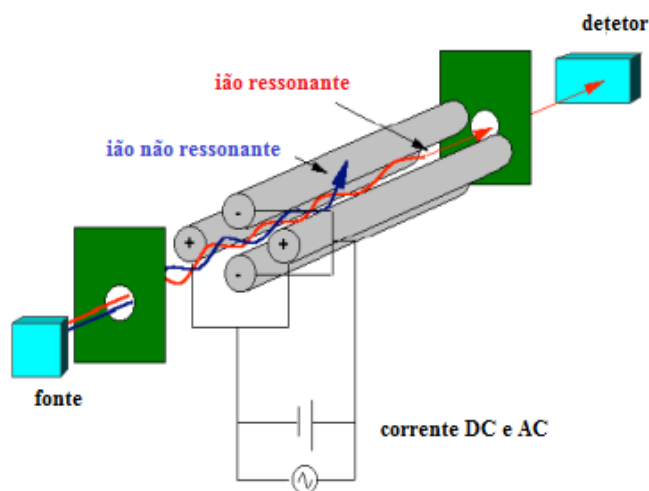


Figura 16 – Representação esquemática de um analisador do tipo quadrupolo (adaptada e consultada em <http://www.chem.vt.edu/chem-ed/ms/quadrupo.html>)

No modo do varrimento contínuo (*scan mode*) a amplitude entre as voltagens DC e RF é mantida constante, de modo a proporcionar um espectro de massa numa região que inclui as massas pretendidas. O método é adequado para as análises qualitativas e quantitativas, quando não se conhece previamente a massa dos analitos.

#### 1.2.3.1.1 - Analisador do Tipo Triplo Quadrupolo QQQ

O analisador do tipo triplo quadrupolo QQQ é constituído por três quadrupolos em série (figura 17). Este analisador combina uma corrente contínua com potenciais aplicados a uma determinada frequência, de forma a seleccionar os iões que vão para uma câmara de colisão. No primeiro quadrupolo são seleccionados os iões precursores, que após serem transferidos para o analisador (segundo quadrupolo, que funciona como câmara de colisão) são fragmentados, como resultado da interação com o gás de colisão (Árgon-Ar ou Azoto-N<sub>2</sub>) para originar os iões produtos. Os iões produto formados são depois direccionados para o terceiro quadrupolo onde são separados de acordo com a sua razão massa/carga ( $m/z$ ).

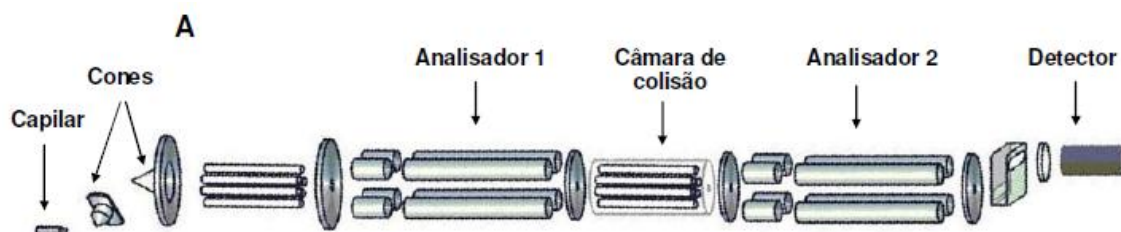


Figura 17 – Representação esquemática de um analisador do tipo triplo quadrupolo (adaptada e consultado em [www.waters.com](http://www.waters.com))

#### 1.2.3.1.2 - Analisador de Armadilha de Iões (Quadrupole Ion Trap- QIT)

O analisador de armadilha de iões é constituído por três eléctrodos: sendo um central, na forma de anel e dois outros situados nas extremidades, denominados de eléctrodos de saída, que possuem uma geometria hiperbólica, o que permite criar um campo eléctrico quadrupolar em 3D. O eléctrodo de entrada apresenta um orifício no centro; que permite a passagem dos iões provenientes da fonte de ionização para o eléctrodo central, onde são armadilhados. Os iões são ejetados e direccionados para o detetor através do orifício do eléctrodo de saída (figura 18).[69]

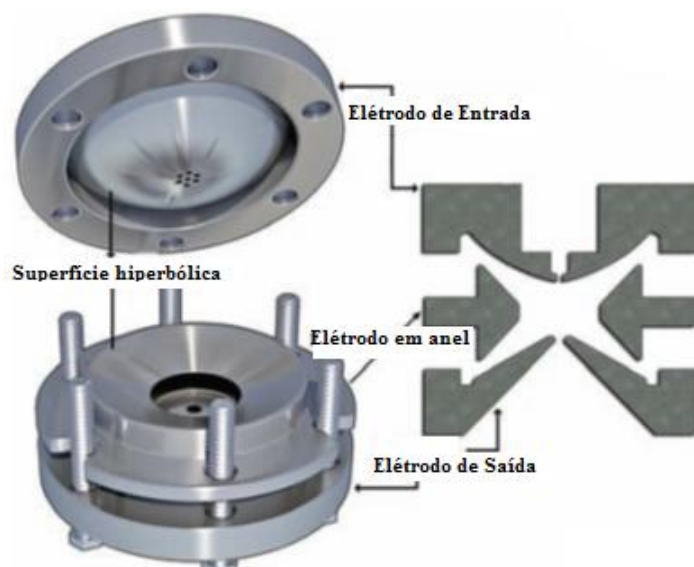


Figura 18 – Representação Esquemática do analisador de armadilha de iões (adaptada a partir da ref. [72])

O campo eléctrico oscilatório gerado mantém os iões aprisionados em órbitas estáveis, por projecção de todos os outros iões para fora da armadilha. Quando é aplicada uma voltagem de elevada frequência, os iões de uma determinada razão  $m/z$  são

sucessivamente ejetados permitindo a obtenção de espectros de massa.

Este analisador possui elevada sensibilidade e apresenta elevada resolução. A sua principal vantagem é a possibilidade de efetuar análises por espectrometria de massa de multi-estágios ( $MS^n$ ), devido à sua capacidade de manter os iões aprisionados. É por isso o analisador mais adequado à análise qualitativa.

### **1.2.4 - Espectrometria de Massa em Tandem $MS^n$**

O desenvolvimento de técnicas de ionização brandas (FAB, ESI e MALDI), contribuiu para a expansão da aplicação da espectrometria de massa à análise de compostos polares e termolábeis. Infelizmente, os resultados proporcionados por estas técnicas de ionização, confinam-se basicamente à produção de espécies protonadas ou desprotonadas com pouca ou nenhuma fragmentação na fonte, limitando-se deste modo à disponibilização da informação estrutural dos espectros de massa obtidos num único estágio. Como consequência desta limitação emergiu a espectrometria de massa em tandem ou em multi-estágios ( $MS/MS$  ou  $MS^n$ ), como uma técnica, que se revela essencial para a análise estrutural de uma vasta gama de compostos biologicamente relevantes tais como fármacos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc.[89, 90]

Existem duas categorias principais de instrumentos que possibilitam a realização de experiências  $MS/MS$  ou  $MS^n$ . A primeira categoria de instrumentos usa uma combinação de espectrómetros de massa dispostos, sequencialmente no espaço. Os casos representativos são geralmente o sequenciamento de dois analisadores do tipo quadrupolo (QQQ), ou de tempo de voo (*Time of Flight Analyzer*-TOF), ou dois analisadores de sector magnético e ou elétrico, ou instrumentos híbridos constituídos por exemplo pela combinação entre eles. A segunda categoria compreende analisadores capazes de armazenar iões e de explorar uma série de eventos em função do tempo. São exemplos os analisadores de armadilha de iões (QIT) e o de Transformada Fourier de Ressonância Ciclotrónica de Iões (FT-ICR). Estes dispositivos permitem a seleção de iões específicos por ejeção de todos os outros. O ião escolhido pode ser excitado e fragmentado, para gerar iões produto, durante um período de tempo selecionado. Este processo pode ser automatizado sequencialmente de modo a que o ião mais abundante em cada etapa de  $MS$  seja retido e fragmentado.[91, 92]

A espectrometria de massa em MS/MS ou  $MS^n$  envolve a ativação de um ião precursor conhecido, formado na fonte e a análise da massa dos respectivos produtos de fragmentação. A ativação dos iões selecionados ocorre por colisão com as moléculas do gás neutro numa célula de colisão. Neste tipo de experiência a etapa de ativação dos iões é crucial para a definição do tipo de produtos resultantes.[89, 91]

Dependendo dos valores de energia de ativação e da natureza do ião precursor as reações de fragmentação em MS/MS permitem proceder a três tipos de varrimento, (*scans*) simbolicamente resumidos na figura 19, que possibilitam a identificação ou a quantificação dos analitos, mesmo em matrizes complexas (extratos de produtos naturais e fluidos biológicos):[88, 89, 91]

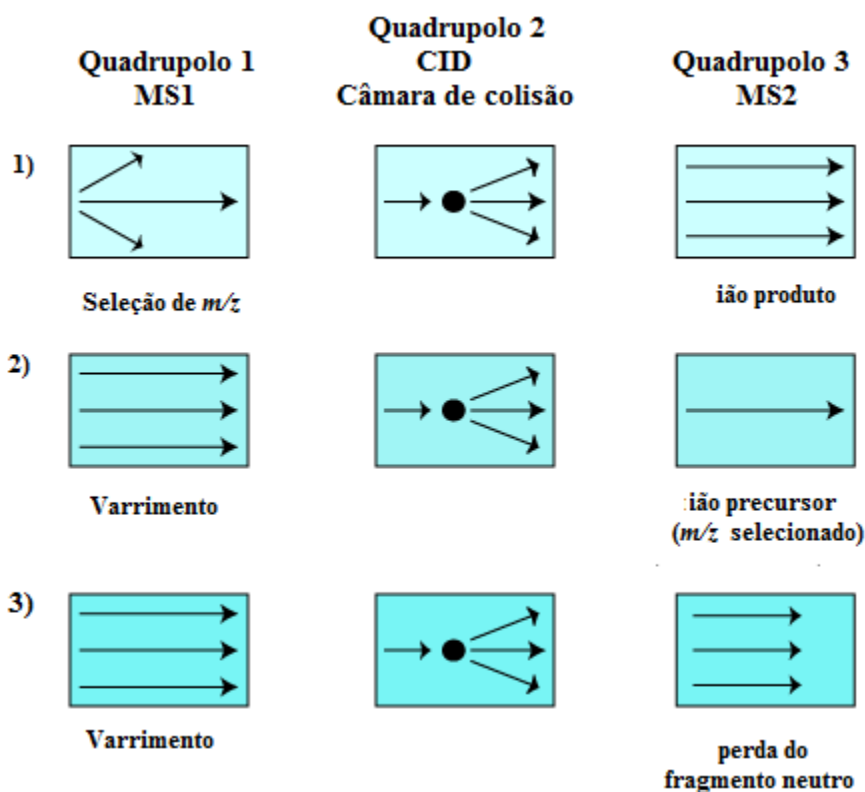


Figura 19 - Elucidação dos diferentes tipos de varrimentos (adaptada e consultada em

<http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/tandem-ms.html>)

Assim, no:

- i) Varrimento do ião produto (*product ion scan*): o ião precursor é selecionado no primeiro quadrupolo Q1 (MS1) e transferido para o segundo quadrupolo Q2 (câmara de colisão), onde sofre a fragmentação através da colisão com um gás

reagente. Os fragmentos formados são analisados no terceiro quadrupolo Q3 (MS<sup>2</sup>). Como resultado obtém-se um espectro específico de MS/MS de um único íão precursor independentemente de quaisquer outros íões presentes. É o método mais comumente empregue e que permite também identificar as transições utilizadas para a quantificação.

- ii) Varrimento do íão precursor (*precursor ion scan*), possibilita a identificação de um determinado íão precursor que originou o íão produto em estudo. O íão produto é selecionado no terceiro quadrupolo (Q3) e pesquisa-se no primeiro quadrupolo (Q1) quais os possíveis íões precursores. O método é particularmente importante para monitorizar misturas onde existem grupos de compostos que dão origem a fragmentos comuns.
- iii) Perda de fragmentos neutros (*neutral loss scan*) o íão precursor e o íão produto são ambos pesquisados no primeiro quadrupolo e no terceiro quadrupolo, respetivamente, de modo a dar origem a um espectro de íões precursores que sofreram a perda de um fragmento neutro em particular (H<sub>2</sub>O, MeOH, CO, CO<sub>2</sub>). O método é útil quando se sabe que a perda de um fragmento neutro com determinada massa é característica de uma classe de composto e se quer identificar na mistura, os componentes pertencentes a essa classe.

A SRM (Monitorização da Reação Seleccionada - *Selected Reaction Monitoring*) é uma ferramenta útil e importante usada para monitorizar com elevada sensibilidade uma transição específica. Neste caso o primeiro quadrupolo está configurado para seleccionar íões com uma massa específica. A energia de colisão é otimizada para produzir o fragmento que será diagnosticado no terceiro quadrupolo. Somente os íões procedentes da transição configurada (precursor>íão produto) podem ser detetados. Este método é ideal para aplicações quantitativas, que requerem elevada sensibilidade e seletividade. A monitorização de mais de uma reação é designada por Monitorização de Reações Múltiplas (MRM - *Multiple Reaction Monitoring*).[69]

Os modos de varrimento do íão precursor e da perda de fragmentos neutros não podem ser executados em espectrómetros de massa, em que os processos ocorrem separados pelo tempo (QIT e FT-ICR)

### 1.2.4.1 - Dissociação Induzida por Colisão

A dissociação induzida por colisão (CID – *Collision Induced Dissociation*) também designada por dissociação ativada por colisão (CAD – *Collision Activated Dissociation*) desempenha um papel fundamental em espectrometria de massa em tandem e continua a ser o método de ativação de iões atualmente mais empregue. Isto deve-se à elevada probabilidade de ocorrência da ativação, quando comparada a outras técnicas, como por exemplo a fotodissociação e à facilidade da variação da energia de colisão e da densidade do gás de colisão, sem haver comprometimento da análise subsequente dos iões produto.[89]

A CID é geralmente abordada como um processo que se realiza em duas etapas. A primeira, denominada por etapa de excitação ou de ativação da colisão (CA – *collision activation*), caracteriza-se pela conversão de uma fração da energia cinética do ião em energia interna, como resultado das colisões com as moléculas do gás neutro. A etapa seguinte ao processo de excitação é a da dissociação unimolecular do ião excitado, que induz à decomposição, com elevada probabilidade de ocorrência da fragmentação [93]

Um dos aspetos importantes da ativação dos iões por colisão é o facto da energia cinética relativa de colisão ser bastante dependente das massas do ião ( $m_p$ ) e das moléculas do gás de colisão ( $N$ ). Deste modo, com o objetivo de tornar a dinâmica da ativação mais simplificada a energia cinética máxima que pode ser transferida na colisão, isto é as energias de colisão obtidas experimentalmente  $E_{lab}$ , são convertidas para o sistema referencial do centro de massa  $E_{cm}$ . Assim, para um ião de massa  $m_p$ , com a energia cinética  $E_{lab}$ , a  $E_{cm}$  é dada pela seguinte equação 1:[89, 94]

$$E_{cm} = \left[ \frac{N}{(m_p + N)} \right] \times E_{lab}$$

**Equação 1 – Fórmula usada para o cálculo da Energia do sistema referencial do centro de massa ( $E_{cm}$ )**

A energia do sistema referencial do centro de massa  $E_{cm}$  das partículas que colidem é o parâmetro importante para determinar a natureza da etapa de ativação do processo de colisão. Representa a quantidade máxima de energia translacional que pode ser convertida em energia interna necessária para a fragmentação.[94, 95]

Todos os processos CID que ocorrem rotineiramente podem ser diferenciados em



duas categorias principais, com base na energia cinética do ião precursor. As colisões de baixa energia, de iões orgânicos de massa moderada (várias centenas de Dalton) ocorrem na faixa de 1-100eV e são geralmente observadas em instrumentos do tipo triplo quadrupolo QQQ, de armadilha de iões QIT e em instrumentos com Transformada Fourier de Ressonância Ciclotrónica de Iões (FT-ICR). Nos analisadores de sector e nos instrumentos TOF/TOF têm lugar as colisões de alta energia, que são geralmente na ordem de quilo eletronsvolts (KeV). As energias de colisão intermédias (100-1000eV), de um modo geral, não ocorrem em espectrómetros de massa em tandem, usualmente empregues. Existem diferenças importantes nos espectros CID resultantes de baixa e de elevada energia de colisão, ou seja, os diferentes princípios de funcionamento dos instrumentos de baixa e de elevada energia de colisão, serão também determinantes para as diferenças nos espectros CID resultantes.[89, 94] Estas diferenças são condicionadas, por vários fatores, nomeadamente: *i*) o tempo de duração da ativação iónica que é relativamente maior nos processos CID, que ocorrem a valores baixos de energia. Nestas condições prevalecem os espectros CID formados através dos mecanismos de fragmentação de baixa energia de ativação; *ii*) a pressão relativamente elevada a que a região de colisão é mantida, vai proporcionar o aumento da quantidade de iões que participam no processo de colisão e, conseqüentemente contribuir para a ocorrência de múltiplas colisões que levam à ativação escalonada do ião precursor. Também a energias cinéticas muito baixas os produtos de reações ião-molécula podem aparecer nos espetros.[69, 89, 91, 94]

Os diagramas de decomposição, resultam de ensaios, que utilizam a CID com o objetivo de estabelecer o mecanismo de fragmentação de um determinado ião precursor. São traçados como função das abundância relativa do fragmento (intensidade do sinal) e da energia do centro de massa  $E_{cm}$  necessária para gerar colisões entre o ião precursor e o gás alvo. Apresentam-se sob a forma aproximadamente sigmoide e permitem também determinar as energias de aparecimento, ou seja a energia mínima que pode ser transmitida a um átomo ou molécula para produzir uma quantidade detetável de cada um dos fragmentos originados.[94]

## 1.2.5 - Contribuição da Espectrometria de Massa na Análise de Antimaláricos

A espectrometria de massa (MS) tem demonstrado ser uma ferramenta analítica crucial na caracterização estrutural e na previsão da estabilidade de novos candidatos a fármacos. Infelizmente há poucos estudos realizados em compostos antimaláricos que possibilitam a previsão da estabilidade, a caracterização de isômeros e a detecção de produtos contrafeitos, por aplicação desta técnica. Existem, sim, trabalhos publicados, com vista ao estudo do perfil farmacocinético, à identificação de metabolitos em fluidos biológicos e à detecção de impurezas através do acoplamento da espectrometria de massa a técnicas cromatográficas.[71]

### 1.2.5.1 - Elucidação Estrutural

Diferentes estudos foram conduzidos com o objetivo de elucidar a estrutura de compostos com atividade antimalárica. São exemplos disso:

*i)* A elucidação estrutural, por espectrometria de massa de bombardeamento com átomos rápidos (FAB) dos compostos obtidos por oxidação da primaquina **8** nomeadamente os compostos **24**, **25** e **26** (figura 20). [96]

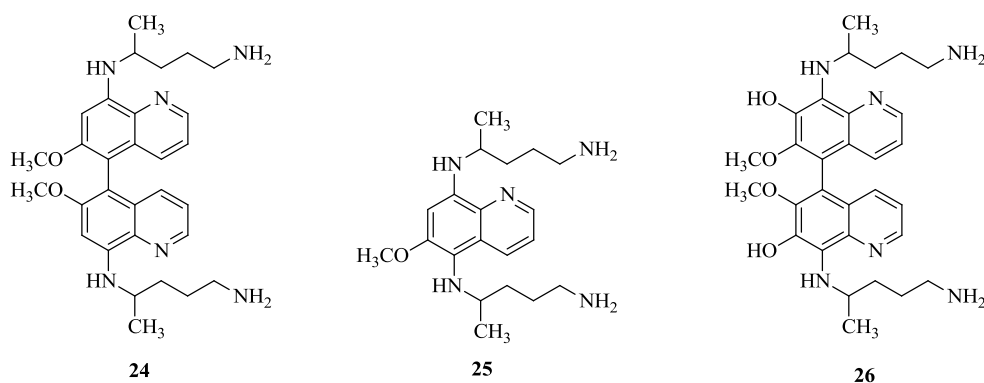


Figura 20 - Derivados obtidos por oxidação da primaquina

Os resultados obtidos neste estudo permitiram estabelecer os mecanismos de fragmentação destes compostos e estudar o efeito da matriz na abundância relativa dos iões detetados.[96]

ii) A identificação, o estudo dos mecanismos de fragmentação e a quantificação da bulaquina ou ablaquina (**15** figura 9) e do seu metabolito principal, a primaquina **8**, em fluídos biológicos, pelo método LC-MS/MS;[97]

iii) O estudo das 4-imidazolidinonas (**14** figura 9) derivadas de **8** e dos seus derivados peptidomiméticos: a primaquina aminoácido prolina (PQAAPro) **27**, e a primaquina prolina aminoácido (PQProAA) **28**, (figura 21), com vista a avaliar as suas propriedades físico-químicas, caracterização e obtenção do padrão de fragmentação por MS<sup>n</sup>. [98-100]

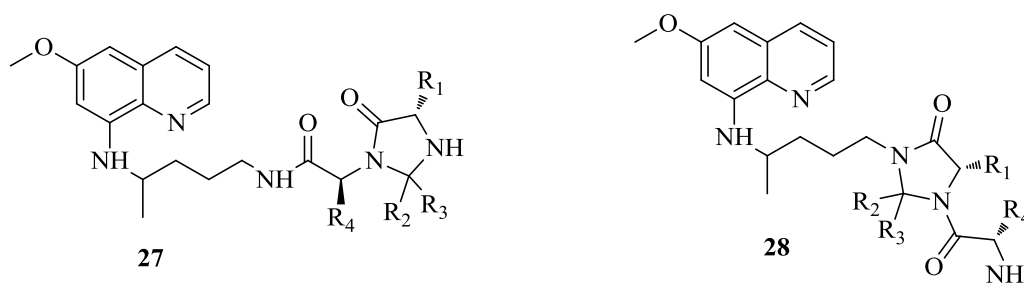


Figura 21 – Estrutura das 4-imidazolidinonas derivadas da primaquina

Os resultados do estudo das 4-imidazolidinonas permitiram por um lado fornecer bases sólidas para estabelecer a ESI-MS como uma ferramenta-chave para a caracterização físico-química de produtos biofarmacêuticos e, por outro, correlacionar a abundância relativa de fragmentos MS/MS gerados, com parâmetros determinantes na relação estrutura-atividade (relacionada com a cadeia lateral aminoácido na molécula), tais como o parâmetro estérico Charton.[98-100]

### 1.2.5.2 - Estudos Farmacocinéticos

Os estudos farmacocinéticos proporcionam informações importantes sobre o percurso do medicamento no organismo, desde a sua ingestão até a sua eliminação, permitindo deste modo o estudo quantitativo dos processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção de fármacos ou dos seus metabolitos (ADME). Para responder a esses desafios a espectrometria de massa, quando acoplada à cromatografia líquida, (LC-MS) tem sido usada com sucesso na quantificação de diferentes fármacos e respetivos metabolitos em fluidos biológicos.

São exemplo disso, o estudo desenvolvido em antimaláricos, usados, na terapia combinada, nomeadamente: artemeter, artesunato, dihidroartemisinina, amodiaquina, N-desetil-amodiaquina, lumefantrina, desbutil-lumefantrina, piperaquina, mefloquina, cloroquina, quinina, pirimetamina e sulfadoxina. O estudo envolveu pacientes de duas regiões do sudeste asiático, com níveis de resistência a antimaláricos, elevados a moderados.[101] Como parte de um projeto multinacional, o estudo visava avaliar o efeito do perfil farmacogenético na farmacocinética dos antimaláricos, com vista a recolha de informações sobre o consumo de antimaláricos nessas duas regiões, onde são usados diferentes tratamentos de primeira linha. Após a otimização das condições analíticas para os ensaios *in vivo* a metodologia por LC-MS aplicada mostrou a presença de um ou de outro antimalárico, em quase metade dos pacientes testados, que afirmaram não ter tomado ou ignoravam se tinham tomado antes qualquer antimalárico. Com base nesta constatação, os autores concluíram ser urgente estabelecer mecanismos que assegurem e garantam o uso apropriado de antimaláricos pelas populações.[101]

Também com base no método de LC-MS procedeu-se à quantificação, da tafenoquina (**16** figura 9), sob a forma de sal succinato em amostras de plasma humano com o objetivo de determinar o comportamento farmacocinético durante as etapas de absorção e eliminação.[102]

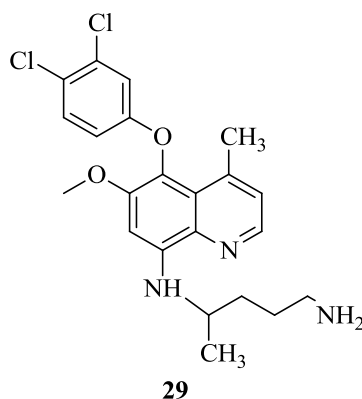


Figura 22 – Estrutura do NPC1161

A avaliação do NPC1161 **29** (figura 22) e respetivos metabolitos, por LC-MS, usando uma fonte ESI e um analisador de tempo de voo (TOF) contribuiu para um melhor conhecimento do comportamento farmacocinético e do mecanismo metabólico desse composto.

A espectrometria de massa também possibilitou o estudo, em plasma de ratos, de outras moléculas com atividade antimalárica, de entre as quais se refere: a pirimetamina **4** e sulfadoxina **6** (figura 3) derivados trioxanos (figura 23), derivados N-alquilamidinas, M64 e de seus respetivos biopercusores.[103-105]

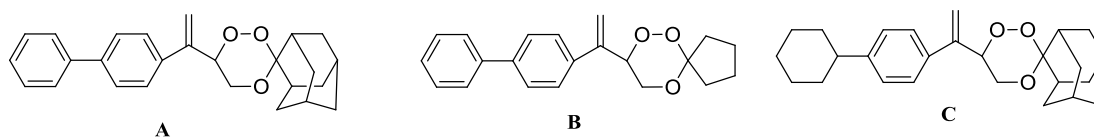


Figura 23 – Estrutura química dos antimaláricos trioxanos

Foram já reportados vários métodos de LC/MS para a quantificação dos derivados da artemisinina e seus respetivos metabolitos, em plasma humano ou em plasma de rato. [106-108]) Neste exemplo destaca-se o estudo conduzido em pacientes pediátricos infetados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH), administrados com niverapina e, simultaneamente co-infetados pelo parasita da malária.[109] O trabalho teve por objetivo estudar o perfil farmacocinético do artemeter **7c** ARM e seu metabolito principal, a dihidroartemisinina **7a** a DHA, também com comprovada atividade antimalárica. Os resultados deste ensaio revelaram que o método analítico era bastante seletivo, permitindo confirmar que a presença da niverapina não afeta a quantificação de ARM e DHA. Por outro a elevada sensibilidade do método, quando comparado aos ensaios anteriormente conduzidos, foi comprovada pela utilização de volumes de plasma reduzidos (50µL), o que constitui vantagem nos estudos clínicos, especificamente nos ensaios pediátricos, onde os volumes de plasma são limitados. [110]

A espectrometria de massa também se revelou particularmente útil na identificação de metabolitos complexos como os que resultam de reações de fase I (mediadas pelas monooxigenases do CYP P450) e de reações de fase II (conjugação com ácido glucorónico, sulfonatos, glutathiona ou aminoácidos). São exemplo disso, os metabolitos da ART e do seu derivado ativo a DHA, que resultaram da hidroxilação e consequente perda de oxigénio na fase I e que nos processos de fase II formaram glucoronídeos. Estes metabolitos foram identificados, *in vitro* e *in vivo*, em amostras biológicas utilizando o espectrómetro de massa híbrido LTQ-Orbitrap associado à técnica de troca on-line de H/D (hidrogénio/deutério).[111]

### 1.2.5.3 - Estudos de Estabilidade

A instabilidade da ARM e da DHA observada durante o processo de quantificação no plasma de pacientes infetados com malária tem sido reportada em numerosos estudos por LC-MS.[109, 112] Como forma de contornar o problema da instabilidade, foram sugeridas várias estratégias, para impedir a degradação da ARM. Partindo do pressuposto de que a degradação desses compostos, no plasma de pacientes com malária, poderia ser induzida, tal como acontece com outros fármacos, pelo ferro II ( $\text{Fe}^{2+}$ ) presente na hemoglobina ou seus derivados foi estabelecido por LC-MS/MS, um método sensível e fiável, que possibilitou a identificação do peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), como um novo agente de estabilização da artemisinina e seus derivados. [109]

Foram também realizados estudos aos derivados das 4-imidazolidinonas com o objetivo de estabelecer a correlação entre os padrões de fragmentação dos compostos **27** e **28** (figura 21) e a sua estabilidade à hidrólise a valores de T e pH fisiológicos. Os resultados obtidos permitiram concluir que os mesmos são muito estáveis à hidrólise sob condições fisiológicas, o que pode ser uma vantagem em termos de biodisponibilidade, uma vez que algumas das 4-imidazolidinonas apresentaram, em roedores, atividade biológica relevante contra a malária.[98]

### 1.2.5.4 – Detecção de Fraudes e Falsificações

A qualidade dos medicamentos que circulam nos países menos desenvolvidos, quer sejam localmente produzidos, importados e/ou provenientes de doações é crítica. Contribuem para esta situação *i)* a produção e comercialização de medicamentos falsificados, que chegam a atingir 50% do total dos medicamentos fornecidos à população; *ii)* a ausência de mecanismos eficazes de regulamentação, de garantia e de controlo da qualidade, bem como *iii)* a ausência de sistemas de transporte e armazenamento adequados capazes de assegurar a manutenção da integridade dos medicamentos e a não ocorrência de degradação química devido à luz, ao calor e à humidade, durante o tempo previsto para a sua validade.[113-115]

O relatório publicado pela OMS em 2011, sobre a qualidade dos medicamentos antimaláricos em seis países da África subsaariana (Camarões, Etiópia, Gana, Quênia, Nigéria e República Unida da Tanzânia) aponta também para a ocorrência, com

demasiada frequência de fraudes e falsificações. As contrafações são também efetuadas através da aposição de novos prazos de validade em medicamentos expirados.[116]

De modo a evitar falhas terapêuticas devidas à incorreta dosagem dos fármacos, que podem contribuir para a reduzida biodisponibilidade do medicamento no organismo e, consequentemente, para o estabelecimento de infeções por estirpes resistentes, torna-se necessário proceder a monitorização da qualidade dos fármacos antimaláricos, através de métodos e técnicas fiáveis, como por exemplo a LC-MS. Infelizmente estas técnicas são dispendiosas, requerem, entre outros, pessoal qualificado e metodologias de preparação de amostras adequadas. As metodologias DART (Análise Direta em Tempo Real), e DESI (Dessorção por Ionização por Electrospray) são frequentemente utilizados, pois são métodos simples que proporcionaram resultados rápidos uma vez que não requerem a preparação das amostras. Estas metodologias proporcionaram resultados satisfatórios no rastreio de antimaláricos potencialmente falsificados.[115, 117-119]

### **1.2.5.5 – Diagnóstico da Malária**

A deteção do *P. falciparum* durante a gravidez é complicada pela sequestração de parasitas na placenta, o que contribui para a redução da sua deteção microscópica no sangue periférico. Com o objetivo de se proceder ao rápido diagnóstico da infeção por malária, foi simultaneamente conduzido um estudo por microscopia ótica, pelo método de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase - *Polimerase Chain Reaction*) e por espectrometria de massa com dessorção por laser (LDMS – *Laser Desorption Mass Spectrometry*). O estudo foi realizado em 45 mulheres zambianas, grávidas e assintomáticas. Os resultados obtidos por microscopia ótica revelaram que todas as mulheres submetidas ao estudo apresentaram resultados negativos. A LDMS permitiu detetar uma carga  $<10$  parasitas/ $\mu\text{L}$  em hemoculturas, comparativamente aos  $<5$  parasitas/ $\mu\text{L}$  detetados por PCR e provou ser um método alternativo de diagnóstico rápido e potencialmente mais sensível do que a técnica microscópica atualmente utilizada para esse efeito.[120]

## **1.3 - Metabolismo dos Fármacos**

### **1.3.1 - Generalidades**

O metabolismo compreende o conjunto de reações, enzimaticamente catalisadas, de biotransformação de fármacos e outros compostos endógenos (xenobióticos – compostos estranhos ao organismo), em produtos quimicamente distintos: os metabolitos. A função principal do metabolismo é a destoxificação do fármaco através da conversão de compostos lipofílicos em compostos hidrofílicos: os primeiros não podem ser excretados pelos rins, enquanto os últimos são facilmente eliminados do organismo através da urina. O metabolismo desempenha, assim, um importante papel na eliminação de fármacos e contribui conseqüentemente para o aumento da sua taxa de excreção, impedindo que estes compostos permaneçam por tempo indefinido no nosso organismo.[121, 122]

Os processos do metabolismo dos fármacos são também importantes nas estratégias de modificação molecular, com especial destaque para a preparação de pró-fármacos, compostos que necessitam de uma biotransformação prévia com vista a que seja promovido o seu efeito farmacológico. O processo de biotransformação dos pró-fármacos consiste essencialmente em converter, mediante modificação química, compostos biologicamente ativos, em forma de transporte inativa, que após sofrer ataque enzimático ou químico libertam o fármaco ativo. A vantagem desta otimização das propriedades dos fármacos é aliada à supressão de barreiras, tais como a baixa solubilidade, sabor ou odor inaceitáveis, baixa biodisponibilidade, e extenso metabolismo pré sistémico.

Por outro lado, o metabolismo dos fármacos pode atuar como um processo de intoxicação, uma vez que pode converter compostos estáveis em metabolitos tóxicos, implicados em diversas patologias, incluindo a carcinogénese e a hepatotoxicidade. [121, 123]



### 1.3.2 - Sistemas Enzimáticos

Todos os tecidos do corpo são capazes de metabolizar, em certo grau, os fármacos, mas o fígado é o órgão central da destoxificação dos xenobióticos e desempenha um papel importante no metabolismo, na depuração e na biodisponibilidade de grande parte dos fármacos. O papel proeminente no metabolismo dos xenobióticos faz também do fígado um órgão sujeito a lesões induzidas por fármacos.[124]

O principal sistema enzimático envolvido no metabolismo de compostos endógenos assim como na destoxificação de moléculas de xenobióticos incluindo medicamentos e poluentes ambientais, é uma hemoproteína oxidativa, na qual o grupo heme é uma porfirina IX contendo ferro coordenado, denominada por citocromo P450. Juntamente com o citocromo P450, participam igualmente, no metabolismo uma flavoproteína (fosfato de nicotinamida adenosina dinucleótido) NADPH-citocromo c reductase que, juntamente com outros constituintes, formam o sistema *oxidase de função mista* ou *monooxigenases contendo flavina* (FMO - *Flavin-Containing Monooxygenase*).[125, 126].

O sistema citocromo P450 é constituído por diversas exoenzimas codificadas pela superfamília de genes CYP e que se encontram agrupadas em 4 famílias principais, nomeadamente: CYP1 - CYP4. As enzimas em cada uma das famílias são diferenciadas por subfamílias, denominadas alfabeticamente e os genes são referenciados numericamente. Cinco enzimas principais nomeadamente: CYP3A, CYP2D6, CYP2C9, CYP1A2 e CYP2E1, ilustradas na figura 24, desempenham um papel chave no metabolismo oxidativo de cerca de 70-80% de todos os fármacos atualmente utilizados.

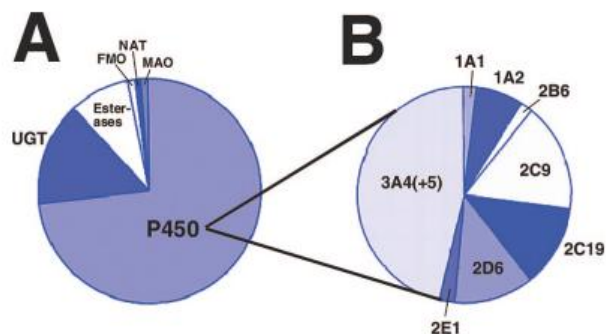


Figura 24 – Distribuição das enzimas CYP no metabolismo de fármacos (segundo um estudo realizado aos fármacos da Pfizer: **A**) Frações de reações catalisadas por diferentes enzimas **B**) Fração que discrimina o contributo individual das enzimas P450) [127]

De acordo com a figura 24, a isoforma CYP3A4 é, segundo um estudo realizado aos fármacos da Pfizer, a mais importante. [128-130]

### 1.3.3 - Reações de Biotransformação

No organismo humano, o fármaco é quimicamente modificado através de reações de biotransformação classicamente divididas em dois tipos: as reações de fase I e de fase II. Embora a classificação seja relevante e útil, a terminologia poderá ser enganosa e antiquada uma vez que as reações de fase II podem ocorrer sem ou antes das reações de fase I, conforme evidenciado na figura 25. De uma maneira geral, são também, respetivamente denominadas por reações de “funcionalização” e de “conjugação” [131, 132]

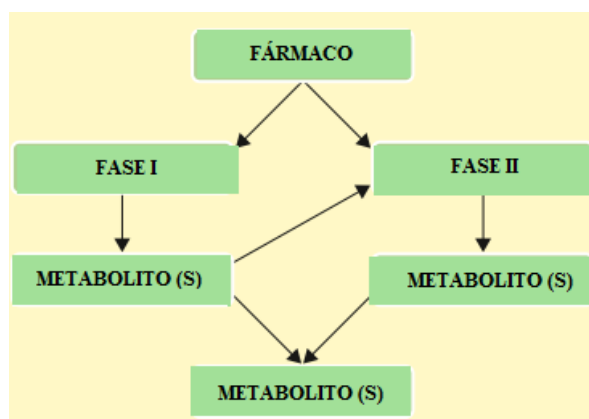


Figura 25 - Representação esquemática do modo de ocorrência das reações de fase I e II durante a biotransformação (adaptada da ref [121])

### 1.3.3.1 - Reações de Fase I

Tipicamente, as reações de funcionalização (também designadas por reações de oxidação/redução e de hidrólise), transformam o fármaco em metabolitos mais hidrofílicos pela adição ou exposição de grupos funcionais polares, como grupos hidroxilo (-OH), tiol (-SH) ou amina (-NH<sub>2</sub>). Geralmente, esses metabolitos são farmacologicamente inativos e podem ser excretados sem qualquer modificação adicional. Alguns produtos de reações de oxidação e de redução necessitam de modificações adicionais antes de serem excretados. Algumas reações de fase I (hidrólise e poucas de oxidação e redução) também podem ser mediadas por sistemas enzimáticos não microsossomais. São exemplos, as reações de oxidação dos álcoois mediadas pela enzima álcool *desidrogenase* ou as reações de oxidação de compostos endógenos que contém amina, mediadas pela monoamina oxidase (MAO).[129, 132-135]

A monooxigenação é o mecanismo enzimático mais frequente e é mediada pelas *monooxigenases*, que possibilitam a introdução de um dos átomos do oxigênio molecular no substrato **X**, de acordo com o esquema 1.[132]



ou



Esquema 1 - Reação de oxidação (Fase I) mediada pelo sistema enzimático do citocromo P450

O mecanismo detalhado do ciclo catalítico de monooxigenação pode ser dividido em sete etapas, conforme ilustrado na figura 26: (1) o fármaco **RH** forma um complexo com o citocromo P450 oxidado ( $\text{Fe}^{3+}$ ); (2) o NADPH doa um elétron à flavoproteína reductase (**Etapa A**), que reduz o complexo P450-fármaco; (3) o oxigênio une-se ao complexo; (4) o NADPH ou o NADH doa o segundo elétron (**Etapa B**), criando o complexo oxigênio ativado-P450-fármaco; (5) o ferro é oxidado, com perda de água e por fim, (6) à medida que o complexo se torna mais ativo, através de rearranjos, o átomo de oxigênio reativo é transferido para o fármaco (7) resultando na formação do fármaco oxidado **ROH**, com a recuperação do P450, no processo.[123, 136-138]

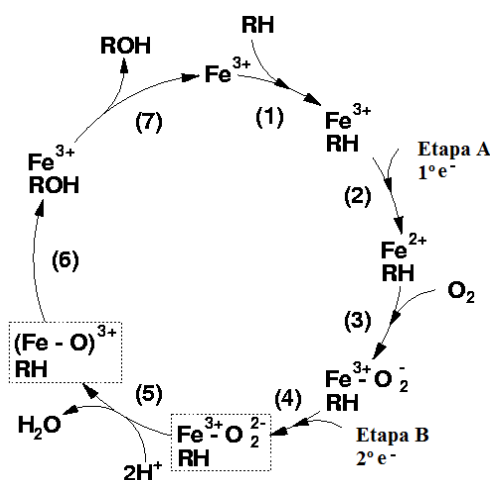


Figura 26 - Ciclo catalítico do citocromo P450 A (adaptado a partir da ref. [138])

Nem sempre a elevada polaridade dos metabolitos da fase I é suficiente para assegurar a sua eliminação por via renal, havendo por isso probabilidade desses metabolitos sofrerem reações subsequentes de conjugação (reações de fase II) com pequenas moléculas endógenas de alta polaridade, que conduzem à formação de conjugados altamente hidrossolúveis que são preferencialmente excretados pela urina ou pela bile.[139]

### 1.3.3.2 - Reações de Fase II

As reações de fase II são catalisadas por várias enzimas *transferases*, nomeadamente a *glucuroniltransferase*, *N-acetil*, a *sulfotransferase*, *glutathione-S-transferases*, que se encontram localizadas no reticulo endoplasmático e no citosol. As *transferases*, tal como as enzimas do P450 diferem uma das outras pela especificidade para com os substratos e também se encontram envolvidas nas interações fármaco – fármaco [121]

A conjugação com o ácido glucorónico é uma das vias mais importante de destoxificação porque os glucurono - conjugados resultantes são menos ativos e mais solúveis em água, quando comparados com o composto precursor. [129, 140]

### 1.3.4 - Estabilidade Metabólica

A estabilidade metabólica é definida como a percentagem de perda de um fármaco-teste na presença de um sistema metabólico ativo (hepatócitos frações S9 ou microsomas).[141] O ensaio, da avaliação da estabilidade metabólica, fornece informações sobre o fluxo (baixo, moderado e alto) com que o fármaco-teste é metabolizado por enzimas específicas (ex. CYP450) em metabolitos. [142]

Os estudos *in vitro* da estabilidade metabólica na fase de desenvolvimento de fármacos são conduzidos com o objetivo de prever a eficácia *in vivo*, possibilitar a triagem de compostos para estudos *in vivo* em animais, fornecer informações que possibilitem as modificações estruturais e a projeção de moléculas que não só possuam a atividade desejada, mas também a duração de ação adequada. [125, 127, 143]

Geralmente, a previsão da estabilidade metabólica para um dado composto em teste envolve a medição da formação do metabolito a partir do composto de ensaio ou o desaparecimento do composto nos microsomas ou hepatócitos. Os microsomas constituem os sistemas mais fáceis de usar e menos dispendiosos e contêm as enzimas membros da família CYP. Os hepatócitos humanos apresentam o sistema mais completo, que contem todas as enzimas metabólicas e cofatores a níveis fisiológicos e ainda uma membrana plasmática intacta que permite uma adequada modelação de concentrações intracelulares. Os hepatócitos possuem a desvantagem de apresentar a

perda da capacidade metabólica durante a incubação.[131, 141, 144]

A medição do desaparecimento do composto pode proporcionar uma estimativa de parâmetros farmacocinéticos, tais como a biodisponibilidade e a semi-vida metabólica ( $t_{1/2}$ ) que pode então ser utilizada para estimar a depuração intrínseca *in vitro* ( $CL_{INT}$  - *intrinsic clearance*). [142, 145]

Para a monitorização do desaparecimento do substrato e deteção do aparecimento dos principais metabolitos, o uso dos sistemas separativos associados à espectrometria de massa é vantajoso pois permite o desenvolvimento de métodos simples, com elevada sensibilidade analítica e seletividade.[146-148]

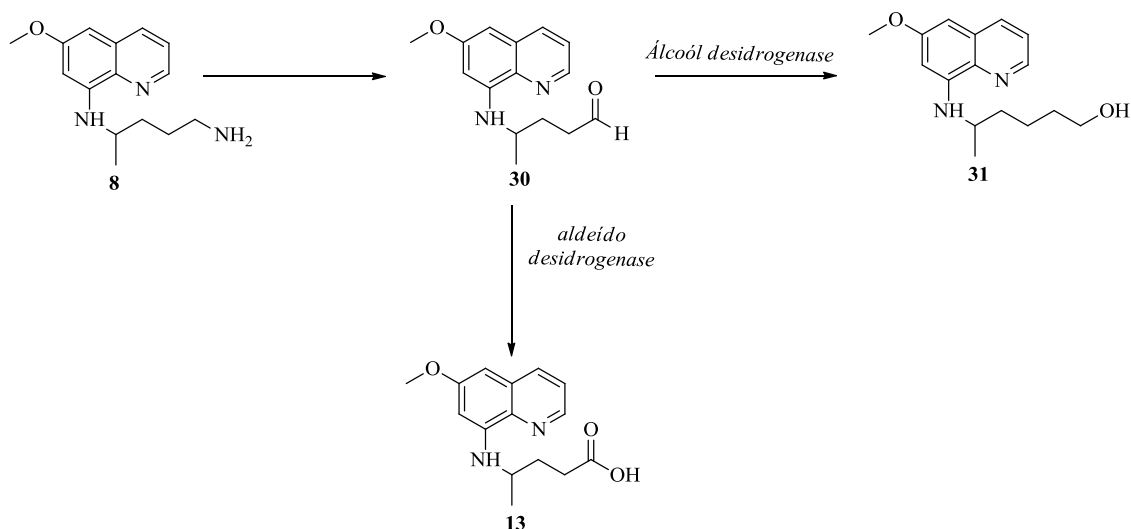
### 1.3.5 - Metabolismo da Primaquina

A primaquina (PQ) **8** é rapidamente absorvida no trato gastrointestinal e concentra-se no fígado, cérebro, coração, pulmões e músculo-esquelético atingindo o pico de concentração no plasma cerca de 1–3h após ingestão. O composto é extensamente metabolizado, o seu tempo de meia-vida varia entre as 4h e as 9h sendo apenas 1-4% da dose eliminada na urina como PQ. Desta forma, pensa-se que a PQ não seja a forma ativa da molécula, uma vez que alguns dos seus metabolitos e derivados apresentam uma atividade superior.[41]

Estudos efetuados com microssomas hepáticos humanos sugerem que ambas as enzimas MAO (*Monoamina Oxidase*), existente na fração mitocondrial e independente da ação do citocromo P450, desempenham um papel importante no metabolismo e na depuração da PQ **8**. [149] As isoformas CYP1A2, CYP2B6, CYP2D6 e CYP2E1 do citocromo P450 (CYP450) foram identificadas como sendo responsáveis pelo metabolismo da primaquina e há ainda dados que sugerem a inibição dos CYPs 1A2, 2D6 e 3A4 e a indução do CYP1A2 pelo composto. [150, 151]

Embora a via de metabolização da PQ não esteja totalmente clarificada, especula-se que a PQ seja predominantemente metabolizada através de um processo que envolve duas fases oxidativas: uma que é mediada pelo CYP450 e pela isoforma A da enzima mitocondrial MAO em que o CYP450 converte a primaquina a carboxiprimaquina (CPQ **13**)) através de um processo de desaminação oxidativa e a MAO catalisa a conversão da primaquina a um derivado aldeído **30** que é posteriormente oxidado pela

enzima aldeído desidrogenase a CPQ **13** (esquema 2).[41, 149, 151]



Esquema 2 - Via metabólica proposta para a cadeia lateral da PQ **8**, (adaptada a partir da ref.[41])

Além disso, existem estudos que indicam que as vias de metabolismo mediadas pelas FMO podem conduzir à formação da CPQ **13** por oxidação da amina primária e/ou do metabolito proposto N-hidroxilado da PQ (PQ-NOH **32** na figura 27), que desempenha um papel potencial na hemotoxicidade [152]

O composto **13** exibe menor toxicidade e menor atividade esquizontocida que a PQ **8**, o que sugere a importância do grupo amina terminal da cadeia alifática na atividade destes compostos. A CPQ **13** não é detectada na urina, o que indica a ocorrência de transformações adicionais, prévias à sua excreção, com provável formação de espécies reativas e tóxicas [41, 153].

Contrariamente à CPQ **13**, alguns metabolitos resultantes da hidroxilação da PQ foram identificados nos fluidos biológicos dos animais tratados, destacando-se a 5 - hidroxiprimaquina **33**, (5-HPQ), a 6-metoxi-8-hidroamilaminoquinolina **34** (MAQ-NOH) na figura 27. Ambos os metabolitos são potenciais responsáveis pela formação de meta-hemoglobina, hemólise dos eritrócitos e depleção da atividade da glutatona (GSH).[153, 154]

Adicionalmente, foram identificados outros metabolitos como, por exemplo, a 6-metoxi-5-hidroxi-8-aminoquinolina **34A**, a 5,6-dihidroxi-8-aminoquinolina **34B**, (AQD), a 4,5-dihidroxiprimaquina **35**, a 5,6- dihidroxiprimaquina **36** (5-H-6-DPQ),

(figura 27), alguns dos quais mostraram interação *in vitro* com a hemoglobina humana, hemolisados caninos e eritrócitos humanos. A hidroxilação da PQ originou compostos mais tóxicos.[41, 151, 155, 156]

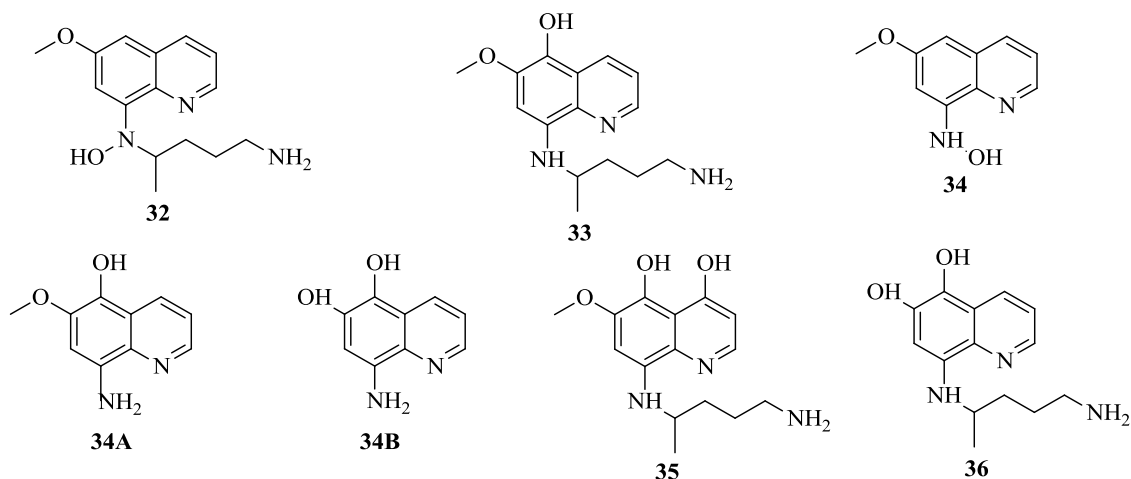


Figura 27 - Metabolitos hidroxilados da primaquina [41]

Foram também identificados metabolitos diméricos da PQ N-acetilada **37 e 38** (figura 28) que não demonstraram atividade antimalárica, reforçando uma vez mais a ideia da importância da amina primária, na cadeia lateral alifática, na atividade antimalárica.

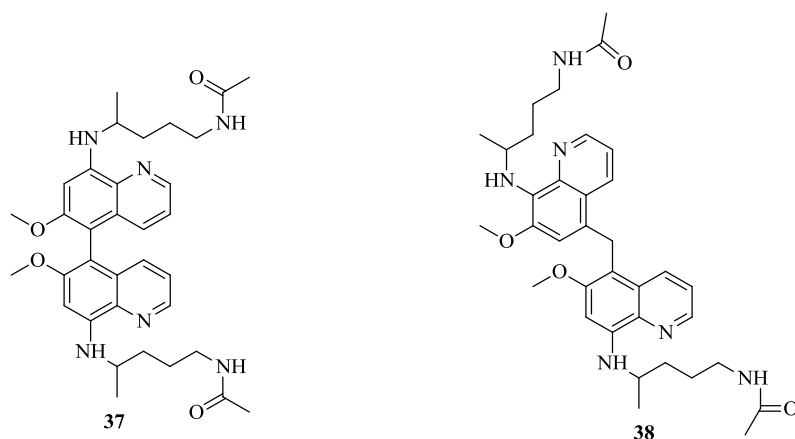


Figura 28 – Metabolitos diméricos da PQ N-acetilada (adaptada da ref: [41])

Contrariamente, os derivados diméricos não acetilados obtidos por oxidação da PQ pelo ião peroxodissulfato PQ (**24 e 26** na figura 20) exibiram atividade gametocida superior à da PQ **8**. [41, 96]

Os metabolitos reativos resultantes atuam suprimindo as defesas celulares, ao



mesmo tempo que atacam macromoléculas essenciais. Contudo e embora não exista ainda informação conclusiva que demonstre se a atividade antimalárica da PQ é devida à sua ação direta ou mediada pelos metabolitos resultantes, a metabolização destas 8-aminoquinolinas parece ser necessária tanto para a sua eficácia como para a sua toxicidade.[41, 155]

### 1.3.6 - Metabolismo da Artemisinina e Derivados Semi-Sintéticos

A artemisinina (ART **7**) e derivados semi-sintéticos são extensivamente metabolizados no fígado, após administração. Uma vez absorvida a ART **7** é principalmente convertida, por ação do citocromo P450, em metabolitos inativos (figura 29) como a deoxiartemisinina **38** e a dihidrodeoxiartemisinina **39**. Em contrapartida, os derivados artesunato, artemeter e arteeter (**7b**, **7c**, **7d**, respetivamente figura 6) são convertidos numa série de metabolitos ativos, de entre os quais se destaca a dihidroartemisinina (DHA **7A**), o principal metabolito ativo da maioria dos análogos usados clinicamente. [60]

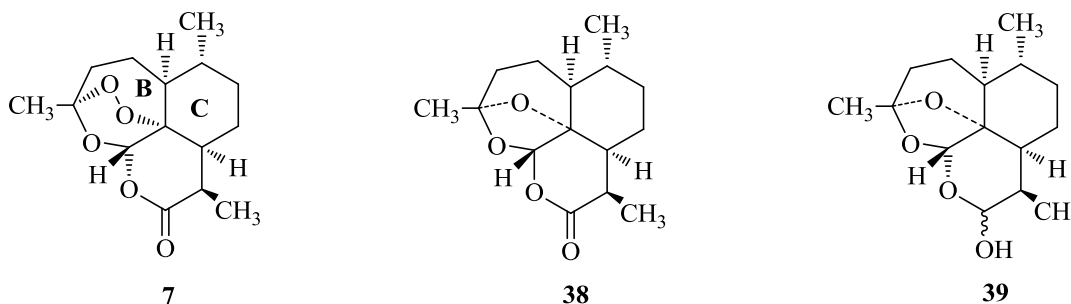


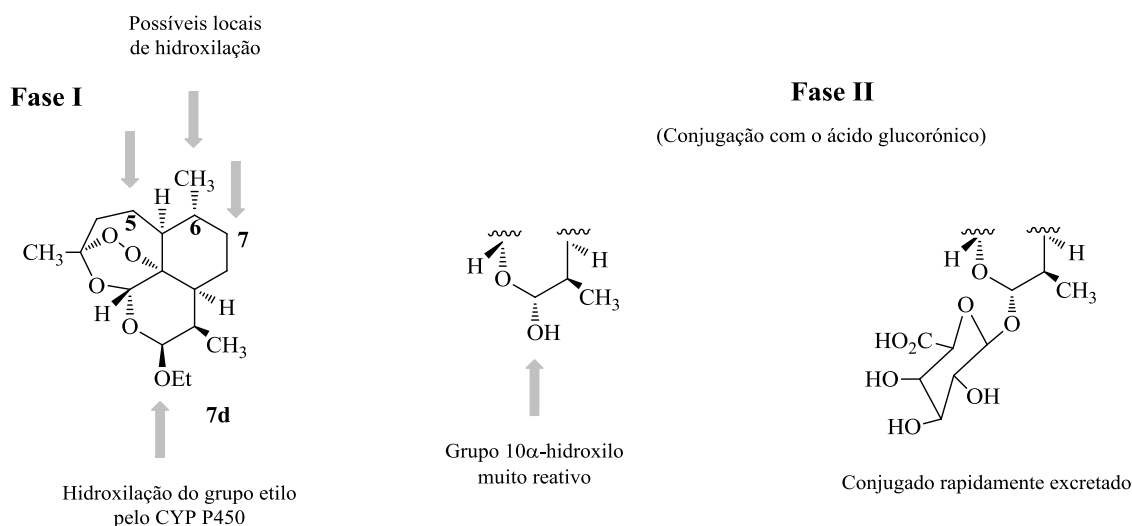
Figura 29 – Metabolitos inativos da artemisinina

Devido à sua estrutura química, a DHA sofre posteriormente conjugação com o ácido glucorónico durante a fase II do metabolismo, originando metabolitos inativos que são rapidamente eliminados por excreção. O  $t_{1/2}$  da DHA é cerca de 40-60 minutos e a velocidade de hidrólise dos derivados neste composto é variável. Enquanto o artesunato **7b** é rapidamente hidrolisado, sendo a sua atividade mediada pela DHA, os derivados lipossolúveis artemeter **7c** e arteeter **7d** apresentam menores velocidades de

conversão contribuindo desta forma para a atividade farmacológica.[60, 157, 158]

De modo a conhecer as vias metabólicas associadas a esta classe de compostos têm sido realizados diversos estudos *in vitro* e *in vivo*, que permitiram identificar que os CYP2B6, CYP2C19 e CYP3A4 e outras enzimas desta superfamília, ainda não identificadas, catalisam as reações características da fase I do metabolismo.[157-159]

O CYP3A4 encontra-se principalmente envolvido no metabolismo do derivado artemeter, catalisando a desalquilação oxidativa (isto é a hidroxilação do grupo metilo do artemeter) deste composto a DHA. Alguns dos metabolitos resultantes das hidroxilações dos derivados da ART 7 nos anéis B e C (figura 29) apresentam atividade antimalárica, apesar de serem rapidamente eliminados pelas reações de fase II do metabolismo com conversão em conjugados solúveis em água, tais como os glucoronídeos. (Esquema 3).[157, 158]



Esquema 3 - Metabolismo (Fase I e II) do arteeter 7d (adaptada a partir da ref. [157]).

É importante referir que, em todos os estudos de metabolismo realizados, até à data, em mamíferos não se verificou inibição irreversível induzida pelos análogos da ART no citocromo P450. Tais observações permitem concluir que o grupo heme destas enzimas não ativa, por redução, estes compostos com formação de radicais centrados no átomo de carbono que consequentemente poderiam alquilar e inibir estas proteínas. Assim, torna-se claro que o citocromo P450 catalisa hidroxilações e *O*-desalquilações, sem interagir com a ponte peroxídica.[157]

## 1.4 – Objectivo da Tese

Os exemplos, referidos na introdução, sobre as inúmeras aplicações da MS na avaliação de novos compostos antimaláricos, nos diferentes estágios de desenvolvimento de fármacos, confirmam a importância desta técnica não só na identificação estrutural de novas moléculas, como também, na previsão e avaliação da sua estabilidade, nos estudos farmacocinéticos de monitorização das concentrações de antimaláricos e metabolitos em matrizes biológicas, na deteção de impurezas e de produtos contrafeitos assim como no controle da qualidade de fármacos comercializados.

O trabalho desenvolvido na presente dissertação teve como objetivo principal a avaliação, por espectrometria de massa de novas moléculas, com atividade antimalárica que atuam por mecanismos distintos e ou sobre novos alvos terapêuticos. Trata-se concretamente, de composto derivados das quinolon-4(1*H*)-iminas e de derivados endoperóxidos híbridos da primaquina–artemisinina (PQ-ART), que não só demonstraram capacidade para atuar nas fases hepática e sanguínea do parasita da malária mas também demonstraram capacidade para bloquear a transmissão do parasita da malária ao mosquito vetor. Estes compostos fazem parte da biblioteca de compostos do grupo Medicinal Chemistry do iMed.Ulisboa, foram sintetizados no decurso deste projeto, por métodos previamente descritos na literatura.[37, 68, 160]

A espectrometria de massa MS com ionização por electrospray e analisador do tipo QQQ, associada ou não a metodologias separativas, cromatografia líquida, foi a metodologia analítica usada para atingir os objetivos pretendidos : *i*) A identificação e caracterização estrutural das moléculas; *ii*) O estudo do seu comportamento na fonte de ionização e no analisador sob diferentes condições de operação do equipamento; *iii*) o estudo da estabilidade dos compostos em microssomas de fígado de ratos e *iii*) o estabelecimento de condições ótimas com vista a possibilitar a pesquisa e a identificação dos metabolitos formados, após a incubação dos compostos em microssomas de fígado de rato.

Os resultados dos estudos efetuados aos derivados das 4-quinolon-(1*H*)-iminas e aos derivados endoperóxidos híbridos da primaquina–artemisinina (PQ-ART), encontram-se respetivamente descritos no segundo e o terceiro capítulo da presente dissertação.

São também parte integrante deste trabalho, 3 capítulos adicionais, sendo no primeiro feita uma breve introdução aos aspetos gerais da malária, da espectrometria de massa e do metabolismo dos fármacos. O quarto capítulo descreve as conclusões e no quinto capítulo, reservado à parte experimental, encontram-se descritos a instrumentação e os procedimentos usados.

O trabalho de investigação desenvolvido e apresentado nesta dissertação constitui parte integrante de 4 publicações: 1 capítulo de livro e 3 artigos científicos:

1 – Sitoe, A.R.; Lopes, F.; Moreira, R.; Varela, A. C.; Bronze, M. R.; *Contribution of Mass Spectrometry to the Study of Antimalarial Agents* “Tandem Mass Spectrometry - Molecular Characterization - 2013. In Tech

2 – Rodrigues, T., Cruz, F. P.; Lafuente-Monasterio, M. J., Gonçalves, D., Ressurreição, A. S., Sitoe, A.R., Bronze, M. R., Gut, J.; Schneider, G.; Mota, M.; M. Rosenthal, P. J.; Prudêncio, M.; Gamo, F.J.; Lopes, F.; Moreira, R. *Quinolone-4(1H)-imines are Potent Antiplasmodial Drugs Targeting the Liver Stage of Malaria*. American Chemical Society - Journal of Medicinal Chemistry **56** (11) 4811-1815

3 – Ressurreição, A. S.; Gonçalves, D.; Sitoe A. R.; Albuquerque, I. S.; Gut, J.; Góis, A.; Gonçalves, L. M.; Bronze, M. R.; Hanscheid, T.; Biagini, G. A.; Rosenthal, P. J.; Prudêncio, M.; O'Neill, P.; Mota, M. M.; Lopes, F.; Moreira, R., *Structural Optimization of Quinolone-4(1H)-imines as Dual-Stage Antimalarials: Toward Increased Potency and Metabolic Stability*. American Chemical Society - Journal of Medicinal Chemistry **56** (19) 7679-7690

4 - Madeira, P. J. A.; Sitoe A. R.; Gonçalves, D.; Rodrigues, T., Guedes, R.; Lopes, F.; Moreira, R.; Bronze, M. R., *Antiplasmodial Drugs in the Gas Phase: A CID and DFT Study of Quinolone-4(1H)-Imine Derivatives*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry **2014** (25) 1650-1661

# CAPÍTULO II

---

## Quinolón-4(1*H*)-Iminas



## 2 – Derivados das Quinolon-4(1H)-iminas

### 2.1 - Identificação e Caraterização Estrutural

A espectrometria de massa (MS), com ionização por electrospray (ESI) e analisador do tipo triplo quadrupolo (QQQ) foi no presente estudo usada, com o objetivo de identificar e caracterizar os compostos antimaláricos derivados das quinolon-4(1H)-iminas, cuja estrutura geral é apresentada na figura 30. Com o objetivo de comparar o comportamento dos compostos na fonte e no analisador, as análises foram também conduzidas num espectrómetro de massa, usando o mesmo tipo de fonte, mas com um analisador de armadilha de iões (QIT).

Estes compostos, referenciados numericamente de **40** a **51**, fazem parte da biblioteca de compostos do grupo Medicinal Chemistry do iMed.Ulisboa e foram utilizados sem purificação adicional.[68, 160].

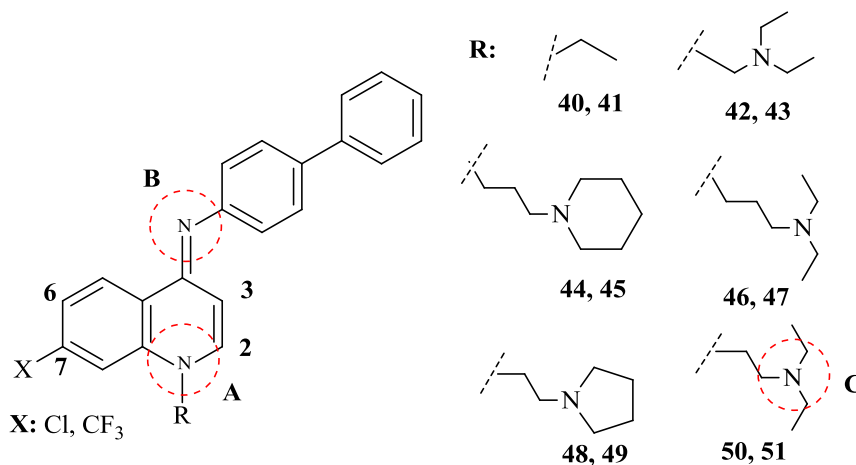


Figura 30 - Estrutura geral dos derivados das quinolon-4(1H)-iminas

Diferem estruturalmente uns dos outros pelo substituinte halogenado, na posição 7 (figura 30) do anel da quinolina (X=Cl e CF<sub>3</sub>), e pelo tipo de cadeia lateral (R) ligada ao N do anel da quinolina. Os compostos **40** e **41**, diferem entre si pelo substituinte halogenado (X=Cl **40**; X=CF<sub>3</sub> **41**) e diferem dos restantes compostos **42–51**, por apresentarem, um grupo etilo, (R=C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>). Os compostos **42–51** apresentam uma N-

alquilamina ligada ao N do anel quinolínico.

As soluções dos analitos, foram infundidas no espectrómetro de massa, operando em modo positivo. Os espectros de massa obtidos possibilitaram a confirmação das massas respetivas às moléculas protonadas  $[M+H]^+$  (anexo I.1). Todas as experiências foram conduzidas após otimização das condições analíticas que consistiram no estabelecimento do potencial do capilar (CP–*Capilar Potential*), para valores correspondentes a maior intensidade do sinal e do potencial do cone (SP–*Source Potential*) para valores que não só proporcionaram uma razão sinal/ruído superiores como também permitiram, a valores superiores de potencial, testar a resistência, dos compostos, à fragmentação na fonte de iões. As condições otimizadas foram empregues para o estudo do padrão de fragmentação utilizando valores variáveis de energias de colisão de modo a prever a formação de fragmentos e estabelecer o mecanismo de fragmentação. Os procedimentos detalhados para esta avaliação estão descritos na Parte Experimental 5.1.1

De acordo com a figura 30 e com estudos previamente efetuados os compostos **40-51**, apresentam dois ou três possíveis sítios de protonação, nomeadamente: o azoto da quinolina (local A), o da imina (local B), e o azoto das alquilaminas (C). O local B, energeticamente mais favorável à protonação foi calculado com base nos valores da afinidade protónica (PA) Ver anexo I.2.[161]

## **2.1.1 - Resultados e Discussão**

### **2.1.1.1 - Otimização do Potencial do Capilar (CP)**

Para otimizar o CP procedeu-se à análise direta por infusão das soluções dos compostos em ACN e avaliou-se a intensidade do sinal em função da variação da voltagem do capilar, entre 1,0 e 5,0 kV. Este estudo é representado a título de exemplo na figura 31.



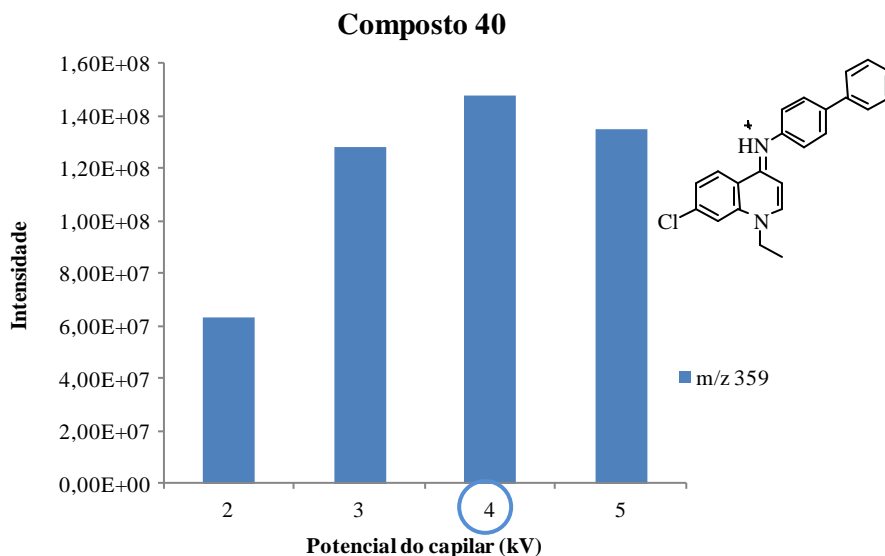


Figura 31 - Efeito da variação da voltagem do capilar no sinal instrumental obtido para o  $m/z$  359 característico de **40**

Os resultados mostram que o valor de potencial do capilar escolhido e que proporcionou o sinal de maior intensidade foi de 4,0kV para os compostos **40** e **41**). Para os compostos **42–51** foi empregue o valor de 3,5kV (ver dados de **41-51** no anexo I.3),

#### 2.1.1.2 – Otimização do Potencial de Cone (SP)

A otimização do potencial do cone permitiu testar a resistência dos compostos à fragmentação na fonte de iões, por aplicação de voltagens entre os 5,0 e 80V.

Como se pode observar na figura 32, que apresenta, como exemplo, a influência de variação da voltagem de cone na intensidade do sinal do ião precursor do composto **40**, o valor ótimo que proporcionou a maior intensidade de sinal, mas com o mínimo de fragmentação foi de 60V.

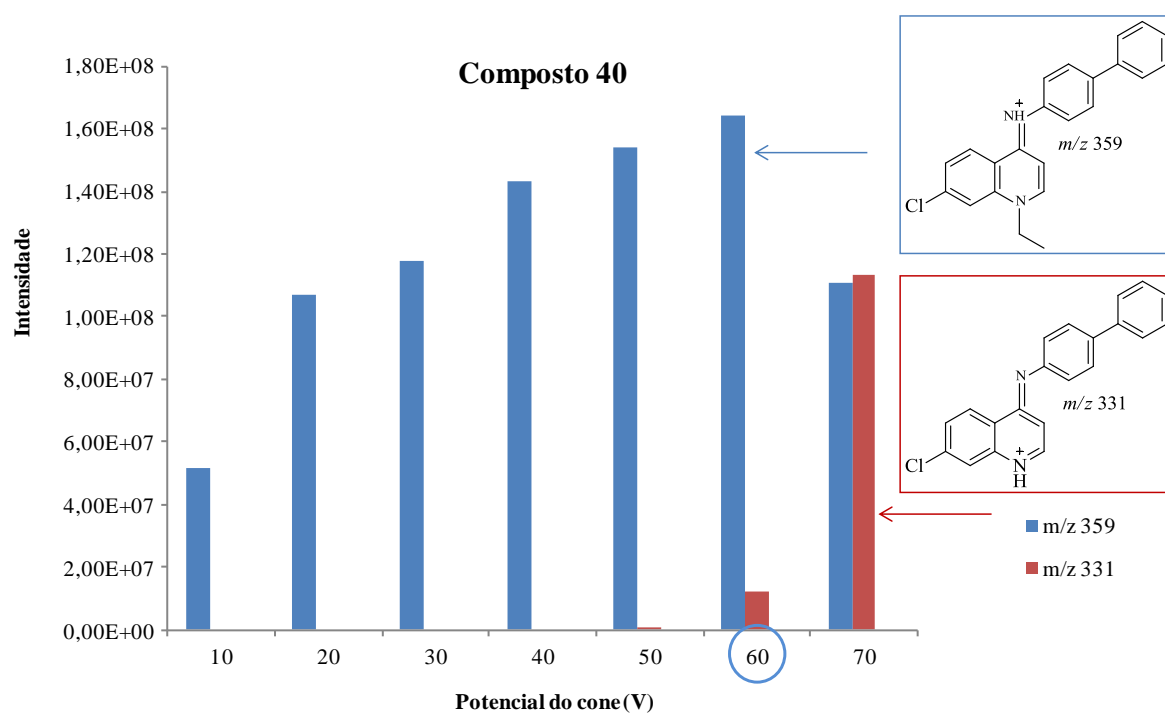
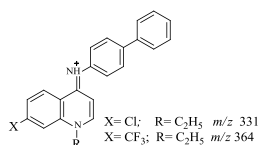


Figura 32 - Variação da intensidade de sinal, obtido para o  $m/z$  359 característico de **40**, em função da voltagem de cone aplicada

Para os restantes compostos a escolha da voltagem do cone foi feita de igual forma. Na tabela 1, encontra-se um resumo do efeito da variação da voltagem de cone, nos iões precursores dos compostos estudados.

Tabela 1- Efeito da variação da voltagem de cone na estabilidade dos iões



Composto	R	X	[M+H] <sup>+</sup>	Potencial do Cone (V)		
				60	70-80	
40	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>		m/z 359	[(M+H)-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>	[(M+H)-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> -Cl] <sup>+</sup>	
41		CF <sub>3</sub>	m/z 393		[(M+H)-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>	
				30-40	50	60-70
42		Cl	m/z 430	[(M+H)-330] <sup>+</sup>	[(M+H)-330-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	
43		CF <sub>3</sub>	m/z 464	[(M+H)-364] <sup>+</sup>	[(M+H)-364-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	
44		Cl	m/z 456	[(M+H)-330] <sup>+</sup>	[(M+H)-330-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	
45		CF <sub>3</sub>	m/z 490	[(M+H)-364] <sup>+</sup>	[(M+H)-364-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	
46		Cl	m/z 458	[(M+H)-330] <sup>+</sup>	[(M+H)-330-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	[(M+H)-330-C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> ] <sup>+</sup>
47		CF <sub>3</sub>	m/z 492	[(M+H)-364] <sup>+</sup>	[(M+H)-364 C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	[(M+H)-364-C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> ] <sup>+</sup>
48		Cl	m/z 428	[(M+H)-330] <sup>+</sup>	[(M+H)-330] <sup>+</sup>	
49		CF <sub>3</sub>	m/z 462	[(M+H)-364] <sup>+</sup>	[(M+H)-364] <sup>+</sup>	
50		Cl	m/z 444	[(M+H)-330] <sup>+</sup>	[(M+H)-330-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	
51		CF <sub>3</sub>	m/z 478	[(M+H)-364] <sup>+</sup>	[(M+H)-364-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	

Para os compostos **42-51** o valor ótimo escolhido foi de 40,0V. A tabela 1 também mostra o resultado do estudo da fragmentação efetuada a valores mais elevados.

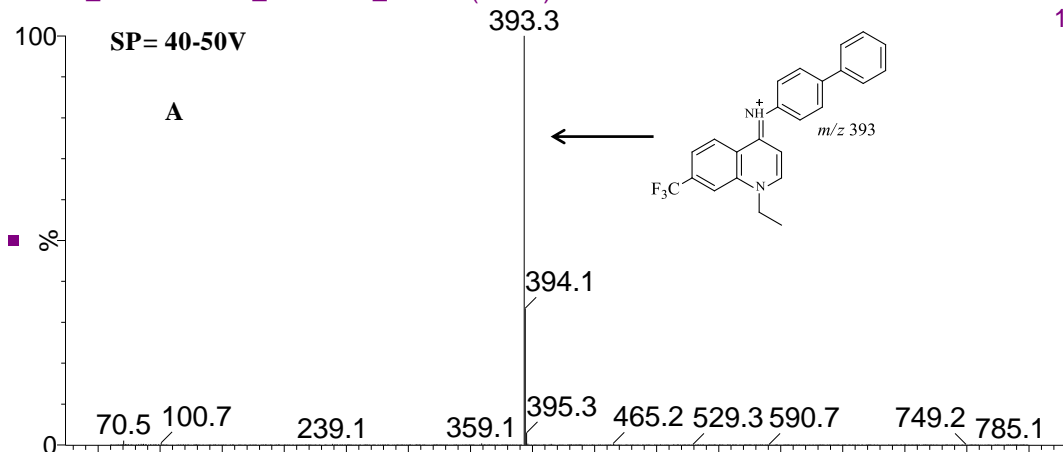
### 2.1.1.3 – Padrão de Fragmentação no Espectrômetro de Massa com Analisador do Tipo QQQ

#### 2.1.1.3.1 – Na Fonte de Ionização

Na fonte ESI observa-se que a valores do potencial do cone  $\leq 60V$ , o espectro de massa dos compostos **40** e **41** ( $R=C_2H_5$ ) e que diferem em  $X=Cl$  **40** e  $CF_3$  **41**, é caracterizado pela presença da molécula protonada  $[M+H]^+$ , conforme ilustrado nas figuras 33A e B.

ESI pos 4.0kV/40V

TR209\_19MAIO2011\_PCONE4\_POS 1 (0.018)

Scan ES+  
1.83e8

TR179\_19MAIO2011\_PCONE4\_POS 1 (0.018)

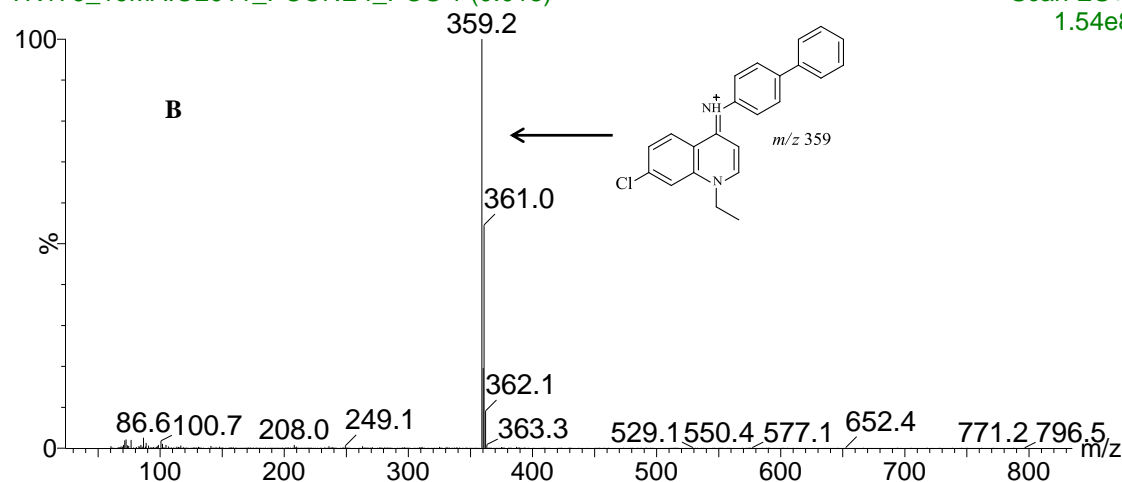
Scan ES+  
1.54e8

Figura 33 – Espectro MS correspondente: A)  $m/z$  359 de **40** ( $X=Cl$ ); B)  $m/z$  393 de **41** ( $X=CF_3$ ) a valores de potencial  $\leq 60V$

A valores de 60V a fragmentação dos compostos traduz-se, pela perda de 28 Da,

correspondentes à cisão do grupo eteno ( $C_2H_4$ ), na posição R, para originar um ião produto  $[(M+H) - 28]^+$   $m/z$  331 correspondente ao composto **40** ( $X=Cl$ ) ou  $m/z$  365 correspondente ao composto **41** ( $X=CF_3$ ). (figura 34A e B).

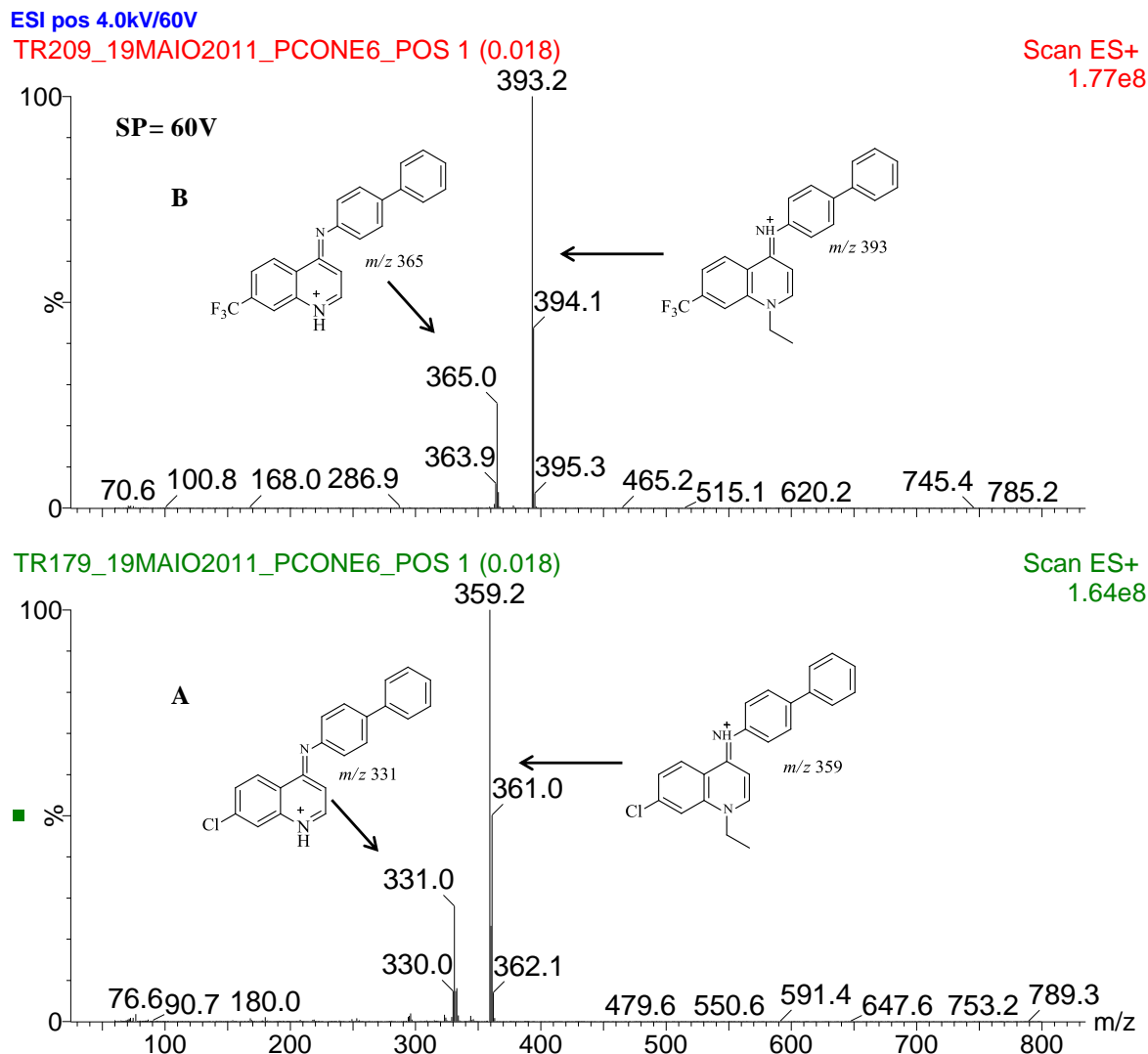


Figura 34 - Espectro MS que ilustra a formação do ião produto A)  $m/z$  331 (**40**) B)  $m/z$  365 (**41**) a valores de potencial de 60 V

A instabilidade dos compostos **42** a **51** começa a ser observada a valores do potencial do cone de 30V. Nestas condições, o padrão de fragmentação caracteriza-se pela cisão da ligação C-N da quinolina para formar fragmentos de alquilaminas ilustrados na figura 35: o ião produto  $m/z$  100 corresponde aos compostos **42** e **43**, que diferem entre si, por apresentarem  $X=Cl$  ou  $X=CF_3$ , como substituinte na posição 7 do anel quinolínico (figura 30); o ião produto  $m/z$  98 corresponde à fração protonada dos

compostos **48** e **49**;  $m/z$  114 aos compostos **50** e **51**;  $m/z$  126 corresponde aos compostos **44** e **45** e o íon produto  $m/z$  128 corresponde aos compostos **46** e **47** (figura 35).

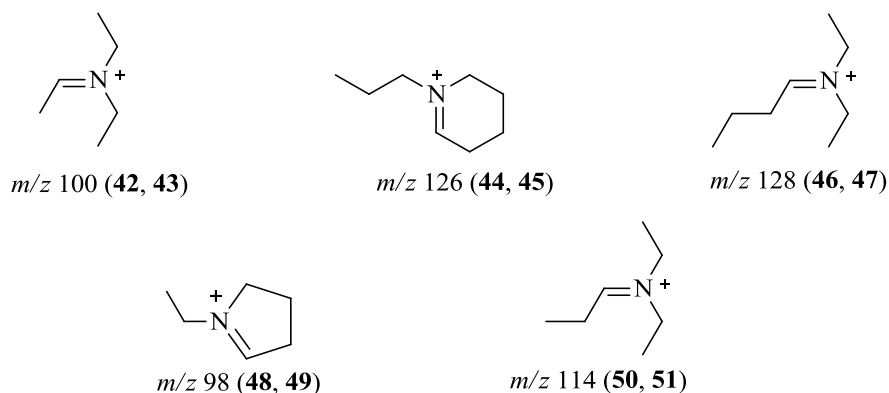


Figura 35 – Iões produto formados na fonte a valores de potencial  $\geq 40V$  resultantes da *N*-desalquilação das quinol-4-iminas **42-51**

De acordo com os dados ilustrados na tabela 1, a partir de valores do potencial de 30V, o íon produto pirrolidínio formado nos compostos **48** e **49**, mantém-se estável até aos 70V. Nos restantes compostos, a valores superiores a 50V ocorre a fragmentação da cadeia *N*-alquilamina, que se caracteriza por perda de  $C_2H_4$  (28 Da). O íon produto formado, resultante dos compostos **42**, **43**, **44**, **45**, **50** e **51** mantém-se estável até aos 70V. Os compostos **46** e **47**, que possuem na cadeia alquílica 4 átomos de carbono, entre os 60 e 70V sofrem perda adicional de  $CH_2$  (14 Da).

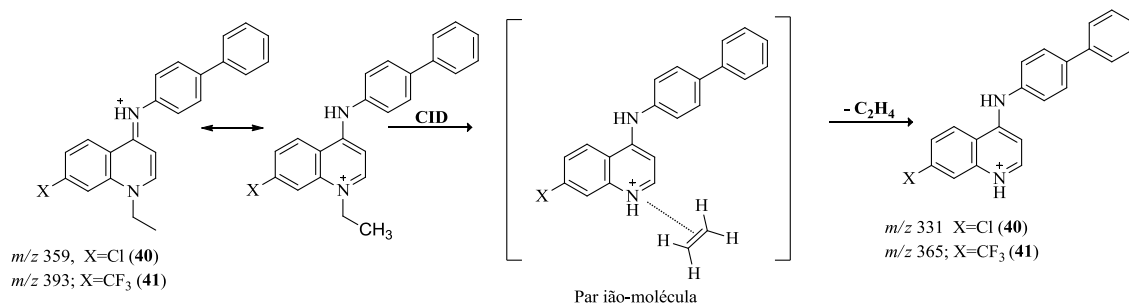
Contrariamente ao observado nas moléculas protonadas dos compostos **40** e **41**, na série de compostos **42-51**, não foram detetados os iões produto correspondentes à estrutura de  $m/z$  331 e  $m/z$  365, ilustradas nas figuras 34A e B.

#### 2.1.1.3.2 - Padrão de Fragmentação na Câmara de Colisão

As experiências MS/MS foram realizadas, por dissociação induzida por colisão (CID), através da variação dos valores das energias de colisão obtidos experimentalmente, até 45eV.

Os espectros de MS/MS das moléculas protonadas dos compostos **40** e **41**, mostram um padrão de fragmentação caracterizado pela formação de iões produto  $m/z$  331 e 365, originados pela perda de eteno ( $[M+H-28]^+$ ). Esta perda pode ocorrer através da transferência de prótons do substituinte etilo para o átomo de azoto da quinolina, com

vista à formação de um complexo par ião-molécula (Esquema 4)



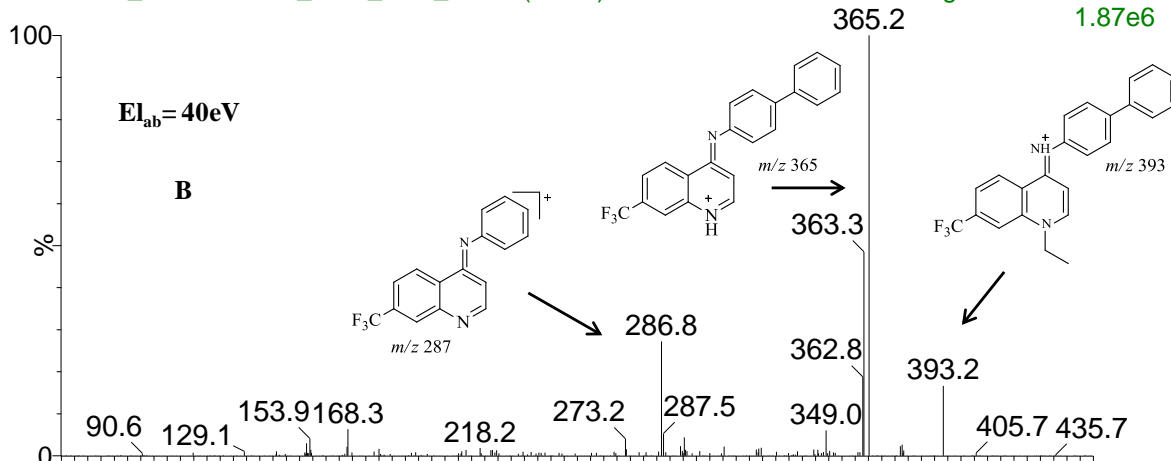
Esquema 4 – Mecanismo de fragmentação proposto, para a formação do par ião-molécula, a partir das moléculas protonadas de **40** e **41**

Também, nas figuras 36A e B, pode-se observar a formação de íons produto adicionais  $m/z$  253 (**40**) e 287 (**41**) resultantes da perda, de 78 Da atribuídos ao benzeno, nas moléculas protonadas **40** ( $m/z$  331) e **41** ( $m/z$  365). O íon  $m/z$  253 do composto protonado **40** pode, a posterior, também perder o radical cloro para formar o íon  $m/z$  218.

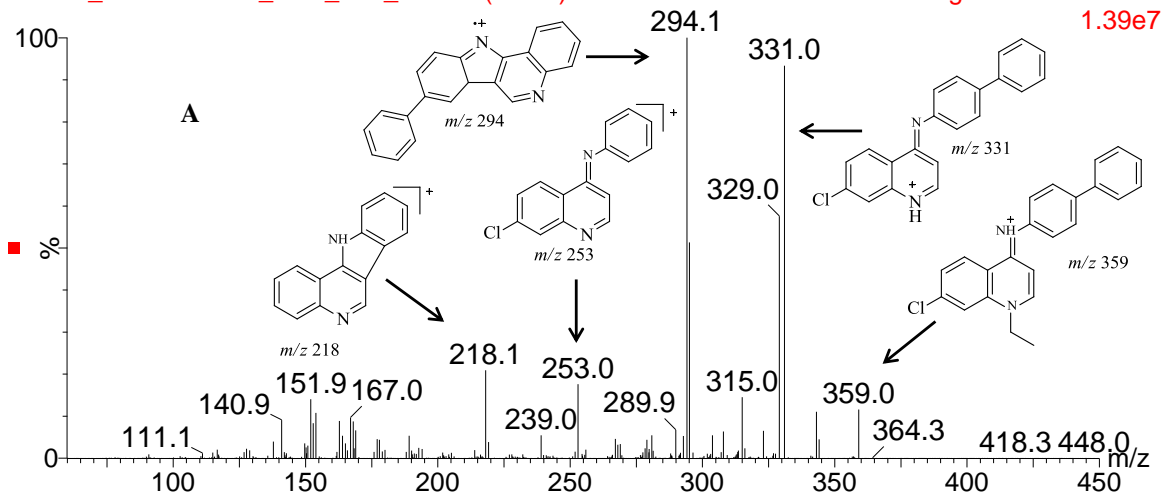
Nos espectros MS/MS apresentados na figura 36A e B podem-se também observar os  $m/z$  329 (composto **40**) e 363 (composto **41**), que se presumem ser formados por perda de etano 30 Da ( $[M+H - 30]^+$ ) a partir das respectivas moléculas protonadas.

ESI pos 4.0kV/40V Ec40eV

TR 209 T6\_ 29AGO2012\_POS\_DS2\_393 6 (0.060)

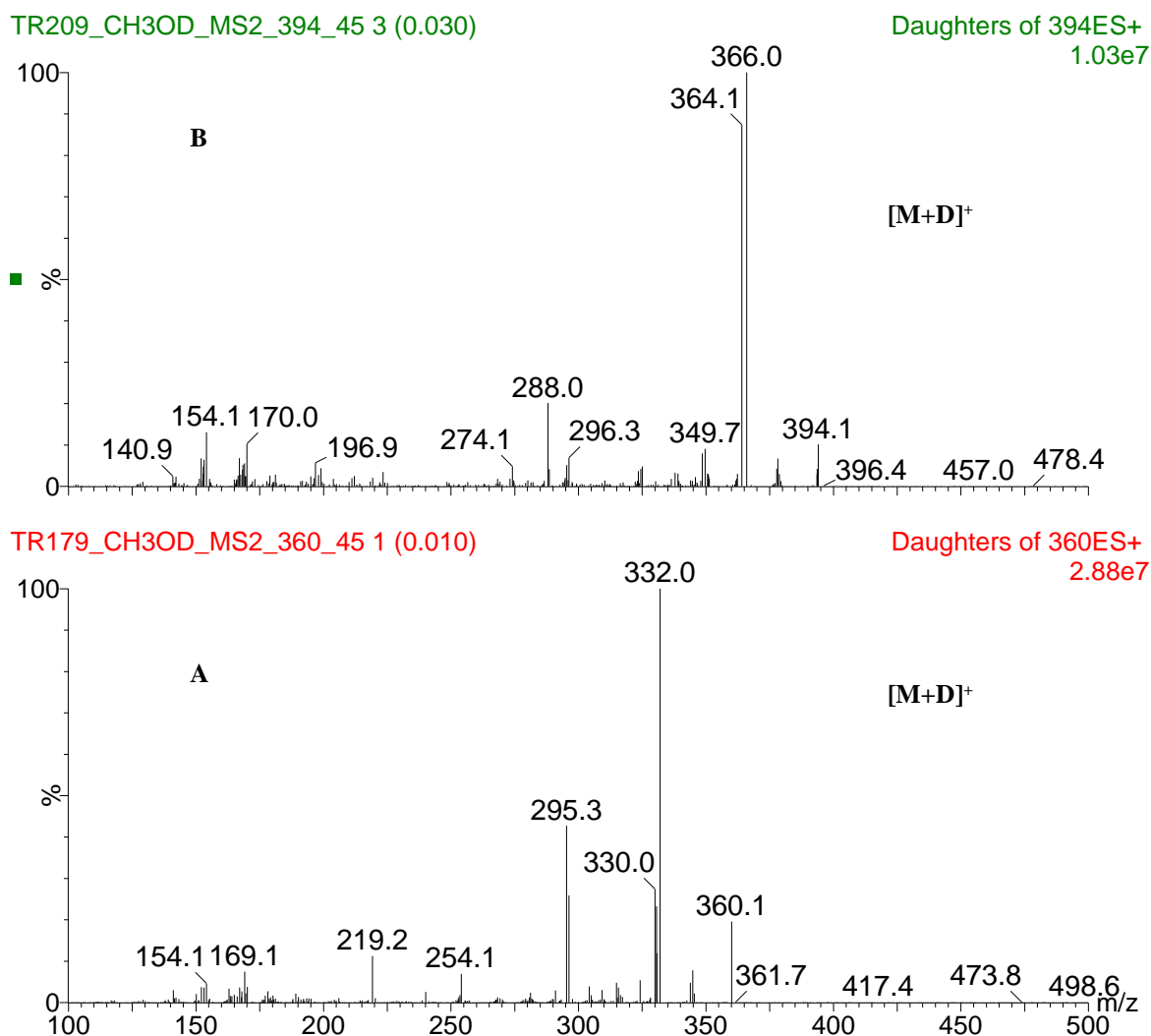


TR179\_19MAIO2011\_DS4\_359\_POS 1 (0.018)

Figura 36 - Espectros MS/MS das moléculas protonadas A) **40** e B) **41**

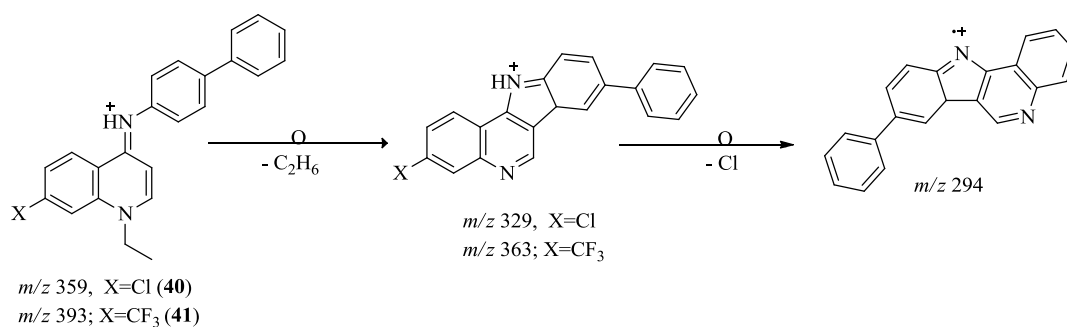
As experiências marcadas com deutério (figura 37) confirmam claramente esta possibilidade, uma vez que as soluções foram preparadas com metanol deuterado (MeOD). Nestas experiências, que resultam da substituição do H<sup>+</sup> pelo deutério observa-se nos espectros de massa resultantes a formação de moléculas protonadas [M+D]<sup>+</sup>, que indicam que o próton hidrogénio foi substituído pelo deutério e que os outros átomos da molécula não participam nestas reações de intercâmbio.



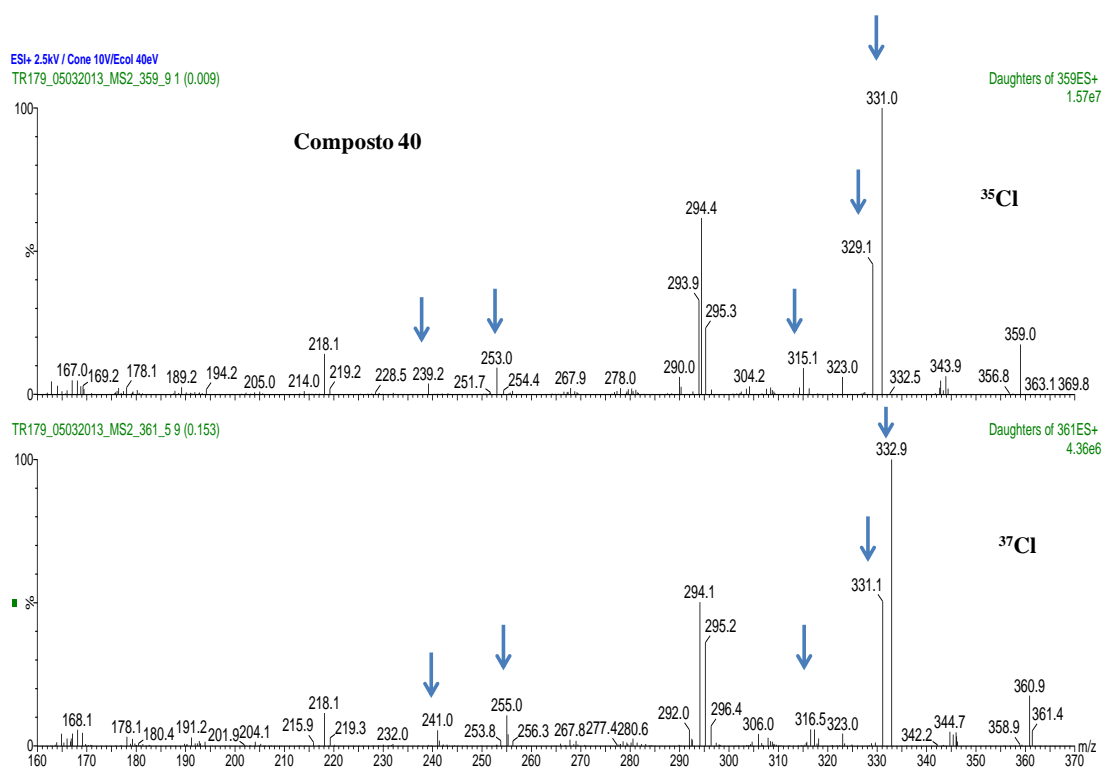


Contrariamente ao mecanismo elucidado no esquema 4, relativo à perda de 28 Da, atribuídas ao eteno e formação do complexo par ião-molécula, que resulta da participação do azoto da imina no processo de fragmentação, a perda de 30 Da ocorre, porque o hidrogénio vizinho do anel da quinolina migra para o substituinte etilo, de modo a proporcionar, através de rearranjos iónicos, a formação de um subsequente anel de cinco membros, para originar os iões produto  $m/z$  329 e 363, de acordo com o esquema 5.

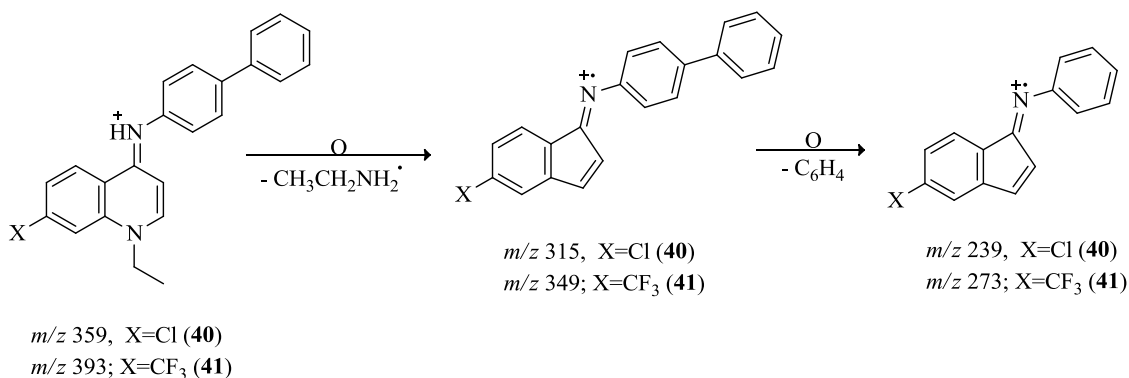
Adicionalmente, o ião da molécula protonada do composto **40**  $m/z$  329, na figura 36, pode perder 35 Da, atribuídos a radicais de cloro, para se obter o ião  $m/z$  294. (ver figura 36 A e esquema 5) Esta perda pode ser devida à ativação sequencial dos iões produto.

Esquema 5 - Mecanismo de fragmentação das moléculas protonadas de **40** e **41**

Uma vez que o composto **40** possui um átomo de cloro, foi possível avaliar qual das transições envolve, na câmara de colisão, a perda de cloro, através do isolamento e fragmentação do pico isotópico <sup>37</sup>Cl da molécula protonada  $m/z$  361. O resultado final é um espectro MS/MS; onde os íons que sofrem uma mudança de  $m/z$  de duas unidades continuam a suportar o átomo de Cl na sua estrutura, conforme mostrado na figura 38. Este procedimento permitiu concluir que os íons produtos  $m/z$  331, 329, 315, 253 e 239 têm o átomo de Cl nas suas estruturas.

Figura 38 – Íons resultantes da fragmentação dos picos isotópicos <sup>35</sup>Cl e <sup>37</sup>Cl, na molécula protonada de **40**

A formação dos íons produto  $m/z$  315 e 349, na figura 36A e 36B, respetivamente, cujo mecanismo de fragmentação se apresenta no esquema 6, resultam da perda de 44 Da, atribuídos ao  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}^\bullet$  no anel da quinolina, ocorrendo um subsequente rearranjo que leva à formação do anel com cinco átomos de carbono.

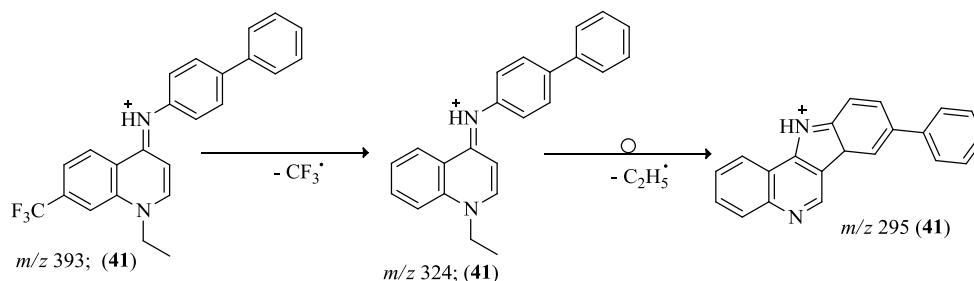


Esquema 6 - Mecanismo de fragmentação das moléculas protonadas **40** e **41**, conducente à formação dos íons  $m/z$  239 e 273 respetivamente

Como apresentado no esquema 6 a perda de 76 Da a partir do substituinte aromático ligado ao grupo imina, conduz à formação dos íons  $m/z$  239 (**40**) e 273 (**41**). Mais uma vez, esta perda pode ser explicada pela ativação sequencial dos íões produto.

A molécula protonada do composto **41** pode perder 69 Da, correspondente ao radical  $\text{CF}_3^\bullet$ , obtendo-se deste modo, o íão  $m/z$  324. Este íão pode por sua vez, perder  $\text{CH}_3\text{CH}_2^\bullet$  (29 Da) para gerar o íão  $m/z$  295, via ativação sequencial dos íões produtos e consequente rearranjo estrutural, conforme mostrado no esquema 7.

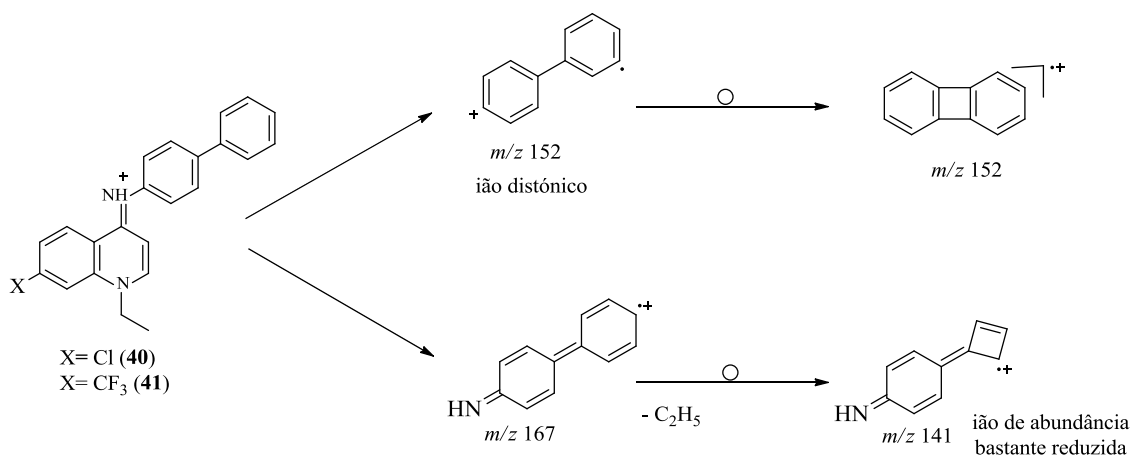
A correspondente perda para o composto protonado **40** não foi detectada.



Esquema 7 - Mecanismo de fragmentação de **41** que origina o íão produto  $m/z$  295

Os íões  $m/z$  167, 152, e 141 observados na figura 36A referente ao composto **40** devem

ser formados por fragmentação do sistema aromático ligado à imina, conforme elucidado no esquema 8. O ião  $m/z$  167 pode ser formado através da clivagem da ligação imina  $N=C$  acompanhada pela migração de um próton para o sistema do anel quinolínico. O ião  $m/z$  152 é formado por perda de 207 Da ( $C_{11}H_{12}N_2X^+$ ) a partir da molécula protonada, via migração de um átomo de hidrogénio a partir do sistema aromático ao anel quinolimínico. Desta perda resulta um ião distónico, que pode por rearranjo formar o catião radicalar bi-fenil. O ião  $m/z$  141 resulta da perda de  $C_2H_2$  no ião  $m/z$  167.

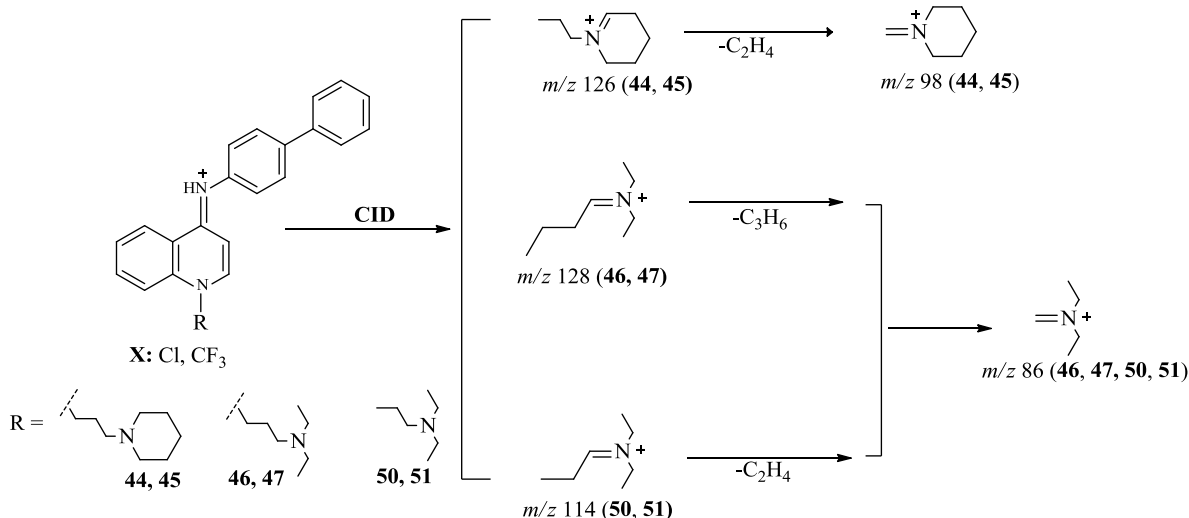


Esquema 8 – Mecanismo de fragmentação proposto para a formação dos iões  $m/z$  167, 152, e 141 a partir das moléculas protonadas dos compostos **40** e **41**

O padrão de fragmentação dos compostos **42-51**, de um modo geral, apresenta apenas um a dois iões produto. Caracteriza-se pela estabilidade das moléculas protonadas a valores de energia inferiores a 10eV. A valores de 15eV ocorre a clivagem da ligação C-N da quinolina, para originar, os iões produto *N*-alquilaminas, ilustrados na figura 35. Como foi anteriormente referido os fragmentos gerados proporcionam iões produto  $m/z$  100 correspondentes aos compostos **42** e **43**,  $m/z$  126 aos compostos **44** e **45**,  $m/z$  128, relativos aos compostos **46** e **47**,  $m/z$  98 para os compostos **48** e **49** e  $m/z$  114 para os compostos **50** e **51**. Tal como na fonte, ao contrário do que foi observado para os compostos protonados **40** e **41**, os iões produto correspondentes à estrutura das aminoquinolinas  $m/z$  331 e 365 não foram detetados.

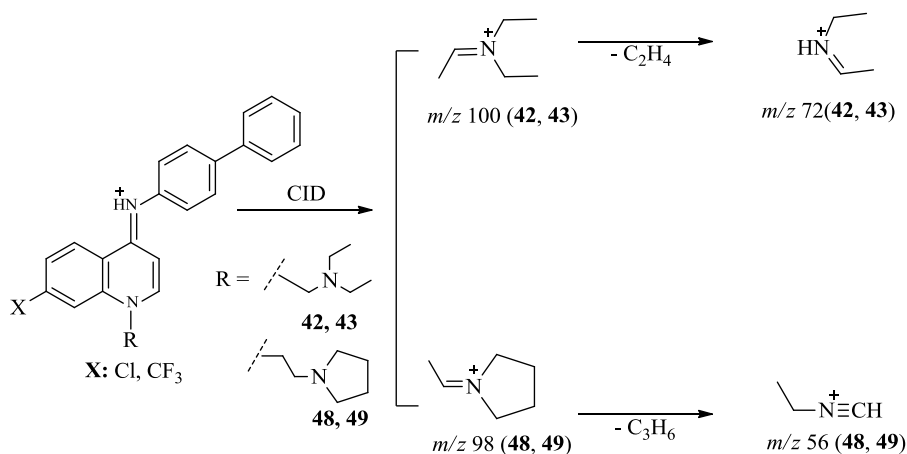
O padrão de fragmentação proposto para estes compostos e elucidado no esquema 9 mostra que os iões produto, respetivos às *N*-alquilaminas, sofrem na célula de colisão, ativação adicional para gerar através da  $\alpha$ -clivagem o ião imónio nos fragmentos

protonados dos compostos **44**, **45**, **46**, **47**, **50**, **51**; (esquema 9) sendo o  $m/z$  98 respetivo aos compostos **44** e **45**;  $m/z$  86 para os compostos **46**, **47**, **50** e **51** (embora com uma baixa abundância para os compostos **46** e **47**).



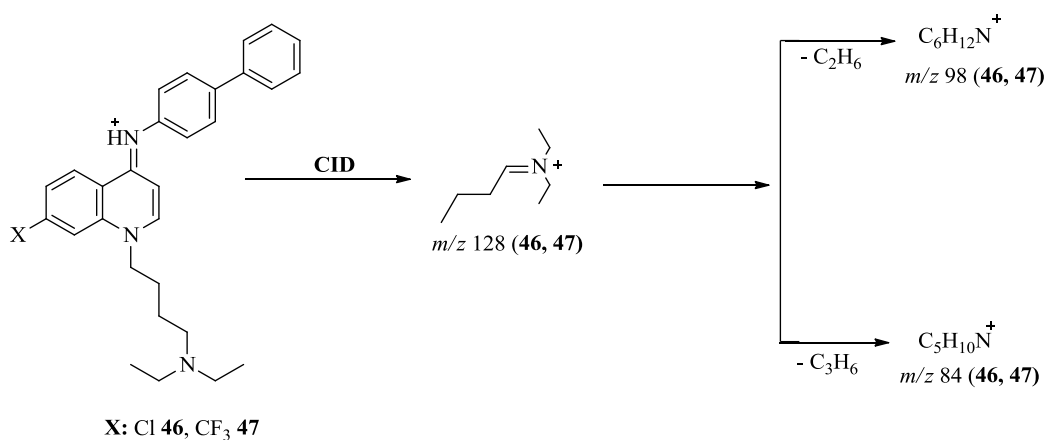
Esquema 9 - Mecanismo de fragmentação das frações protonadas  $m/z$  126, 128 e  $m/z$  114 característicos dos compostos **44-47**, **50** e **51**

Contrariamente ao observado nestes compostos, nas moléculas protonadas dos compostos **42**, **43**, **48**, e **49** (esquema 10), não se forma o ião imónio, mas ocorre a perda de  $C_2H_4$  (28 Da), condicionada, provavelmente, pela reação de  $\beta$ -transferência de hidrogénio para favorecer a formação do ião  $m/z$  72, nas moléculas protonadas **42** e **43**;  $m/z$  98 para as moléculas dos compostos **48** e **49**. Posteriormente, o ião  $m/z$  98, perde 42 Da ( $C_3H_8$ ) para gerar ião  $m/z$  56 (esquema 10).



Esquema 10 – Mecanismo de fragmentação das frações protonadas  $m/z$  100 e 98 características de **42**, **43**, **48** e **49**.

A fragmentação de  $R^+$ , respetivo aos compostos **46** e **47**, que apresentam em relação aos compostos **42**, **43**, **50** e **51** a cadeia *N*-alquílica mais longa (4 carbonos) leva igualmente á formação de dois iões adicionais:  $m/z$  98, resultantes da perda de 30 Da ( $C_2H_6$ ) e  $m/z$  84 atribuído à perda de 44 Da ( $C_3H_8$ ). (esquema 11)



Esquema 11 – Mecanismo adicional de fragmentação das moléculas protonadas **46** e **47**

Os dados obtidos por indução da fragmentação, como resultado da colisão entre os iões e o gás de colisão, permitem confirmar a ocorrência da ativação sequencial na câmara de colisão do triplo quadrupolo, que se traduz pela redução da abundância do primeiro ião produto para favorecer o aumento da abundância do segundo ião. A redução da abundância deste último favorece, o aparecimento e o aumento da intensidade de um terceiro ião fragmento.

#### 2.1.1.4 - Padrão de Fragmentação no Espectrômetro de Massa com Analisador de Armadilha de Iões (QIT)

##### 2.1.1.4.1 - Padrão de Fragmentação na Fonte de Ionização

Todos os compostos exibem o ião correspondente à respectiva molécula protonada, a valores de potencial do cone (SP) inferiores a 187,3 V (skimmer voltage). Contrariamente ao observado anteriormente, na série de compostos **40** e **41**, ( $R=C_2H_5$  e  $X=Cl$  ou  $CF_3$ ), a valores de potencial da fonte superiores a 187,3V somente o composto **40** ( $X=Cl$ ) exhibe um ião produto  $m/z$  331, resultante da perda de 28 Da, correspondentes à cisão do substituinte R. O composto **41** ( $X=CF_3$ ) mantém-se estável ao longo dos ensaios efetuado (ver anexo I.4)

Na série de compostos **42-51**, os compostos **42**, **43**, **45**, e **48-51**, que apresentam a cadeia *N*-alquílica até 3 carbonos, ( $C_n$ ;  $n \leq 3$ ), independentemente do X, na posição 7 do anel quinolínico ser Cl ou  $CF_3$ , assim como o composto **47**, com  $C_n$ ;  $n=4$  e  $X=CF_3$ , mantêm-se estáveis a todos os valores de potencial empregues (107,1 a 251,5V), isto é, não se fragmentam. Este comportamento pode ser provavelmente, condicionado pelo comprimento da cadeia alquílica nos compostos ( $C_n$ ,  $n \leq 3$ ), como também pode ser, nos compostos **47** ( $C_n$ ;  $n=4$ ), devido ao efeito electroatractor do substituinte halogenado ( $X=CF_3$ ) na posição 7 da cadeia alquílica.

O padrão de fragmentação dos compostos **44** e **46** com mais de 3 C e  $X=Cl$ , a valores de potencial superiores a 187,3V caracteriza-se pela *N*-desalquilação, para formar respetivamente os iões produto  $m/z$  126 e 128, ilustrados na figura 35.

##### 2.1.1.4.2 - Padrão de Fragmentação na Câmara de Colisão

A fragmentação dos compostos foi iniciada a partir de valores de amplitude de fragmentação (FA - *Fragmentation Amplitude*) superiores a 0,6.

A fragmentação dos compostos **40** e **41**, neste caso é menos extensa em relação a que ocorre no QQQ. É, caracterizada por fragmentos correspondentes à cisão de R, embora com a abundância relativa, comparativamente baixa. No composto **41** ( $R=C_2H_5$ ,  $X=CF_3$ ), a fragmentação do grupo etilo, ocorre a valores de amplitude de fragmentação situados entre 0,6-0,9.

Tal como na fonte, os compostos **43**, **45**, **47**, **48**, **49** e **51** com 3 ou 4 átomos de carbono e  $X=CF_3$ , caracterizam-se pela estabilidade ao longo de toda a gama de valores de energia empregue pois só exibem o ião correspondente á molécula protonada  $[M+H]^+$ . A estabilidade de  $[M+H]^+$  dos composto **48**  $m/z$  428 ( $X=Cl$ ) e **49**  $m/z$  462 ( $X=CF_3$ ) com 2 átomos de carbono na cadeia alquílica, em todo o intervalo de amplitude de fragmentação (FA) usado, pode ser provavelmente, devida ao efeito de ressonância do anel pirrolidínico, ligado em ambos casos ao N do anel quinolínico.

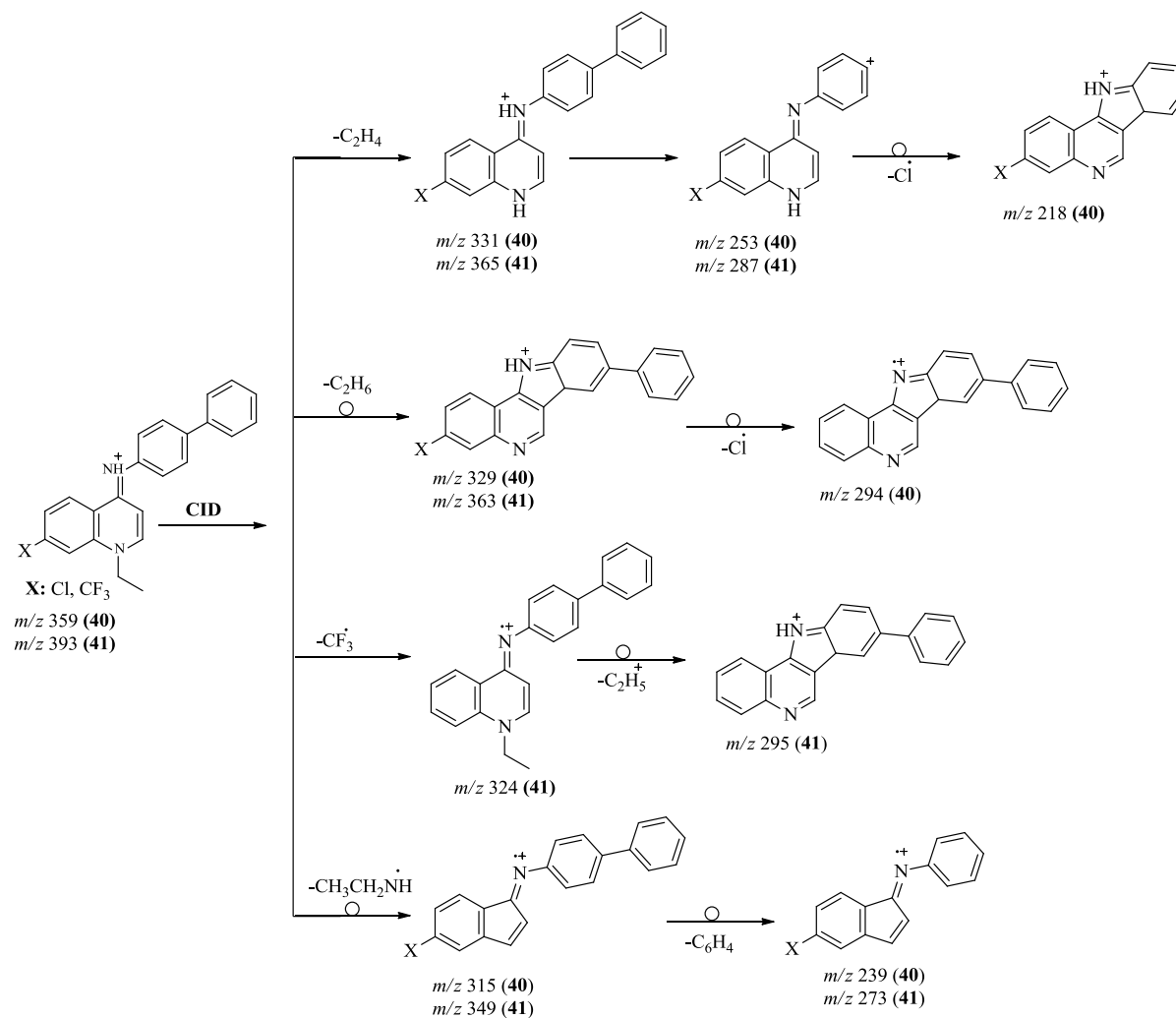
Nos compostos **42**, **44**, **46** e **50** ( $X=Cl$ ), a fragmentação que ocorre é também simples e caracteriza-se como anteriormente descrito pela *N*-desalquilação para formar os iões produto que lhes são característicos e que foram previamente descritos para o equipamento QQQ (figura 35).

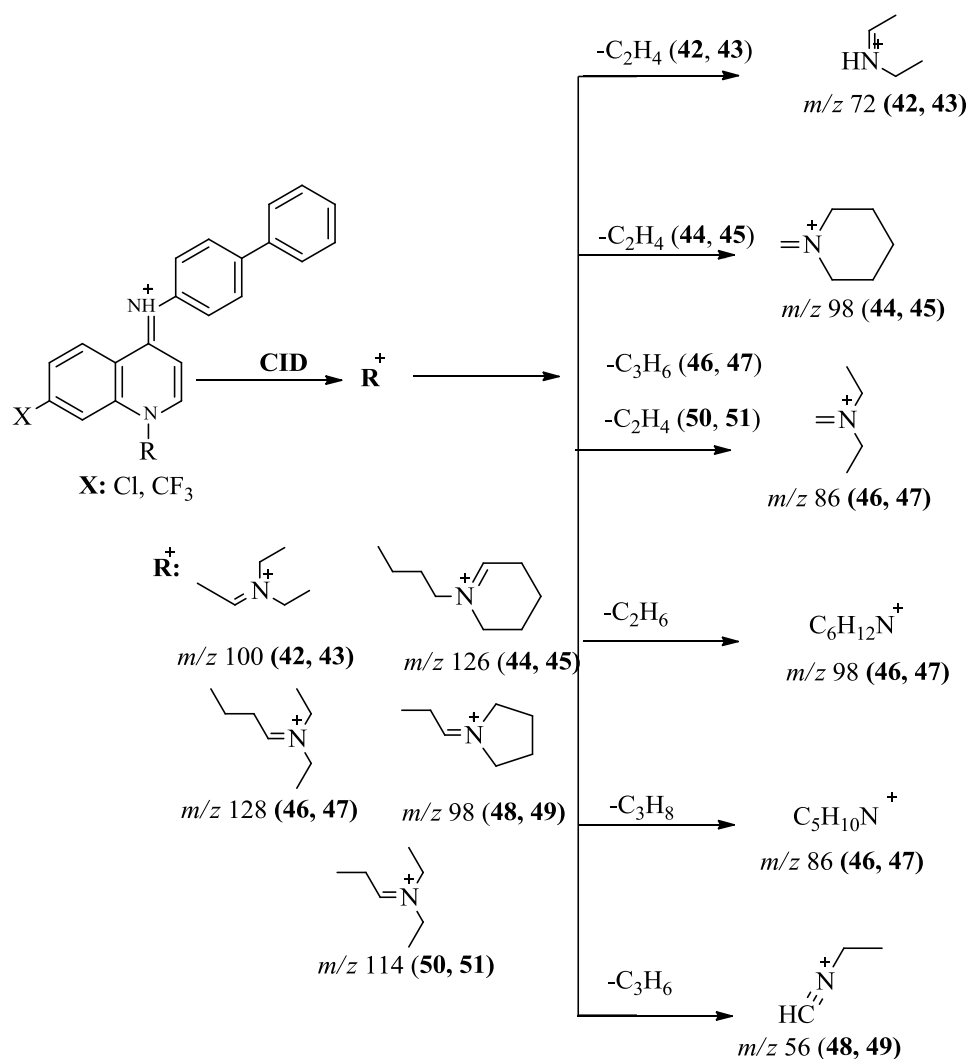
A fragmentação  $MS^3$  foi efetuada somente nos iões fragmento, que apresentavam maior abundância relativa:  $m/z$  331 no composto **40**,  $m/z$  126 no composto **44** e  $m/z$  128 no **46**. Os resultados obtidos a valores de amplitude de fragmentação superiores a 0,7 mostram os iões produto (com reduzida abundância), sendo  $m/z$  294 para o composto **40**, resultante da perda de  $^{37}Cl$ ;  $m/z$  98 para o composto **44**, resultante da perda de  $C_2H_4$  e  $m/z$  84 para o **46**, resultante da perda de  $C_3H_6$ .

Segundo os resultados obtidos, a fragmentação de todos os compostos no QIT tem início a partir de valores de amplitude de fragmentação de 0,7 e a facilidade dos compostos se fragmentarem depende de dois fatores fundamentais: *i*) o tamanho da cadeia alquílica: quanto maior for o número de carbonos na cadeia alquílica, maior é a facilidade com que os compostos se fragmentam; *ii*) o efeito electroattractor do substituinte halogenado na posição 7 do anel da quinolina que quanto maior for, maior será a estabilidade do composto.

Comparando os resultados obtidos nos dois tipos de equipamento empregues: espectrómetro de massa com analisador do tipo QQQ e espectrómetro de massa com analisador de QIT, sob condições analíticas descritas, pode-se concluir, de um modo geral, que o padrão de fragmentação de todos os compostos derivados das quinolon-4(1H)-iminas, sumariado no esquema 12 caracteriza-se pela *N*-desalquilação, que pode ser considerada, no QQQ, bastante extensa e complexa para os compostos **40** e **41** e simples, com dois a três fragmentos, dependendo do comprimento da cadeia alquílica, nas moléculas protonadas dos compostos **42-51**, conforme mostrado no esquema 13.



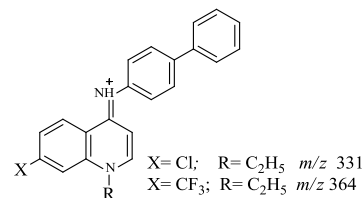

 Esquema 12 - Padrão de fragmentação das moléculas protonadas dos compostos **40** e **41**



Esquema 13 - Padrão de fragmentação das moléculas protonadas dos compostos 42-51

A fragmentação no analisador de QQQ, proporciona mais fragmentos e consequentemente mais informação relativa à caracterização estrutural dos compostos estudados. No entanto, os resultados obtidos no QIT, sumarizados na tabela 2, não só confirmam os fragmentos e o mecanismo de fragmentação dos compostos, como também proporcionam informação adicional sobre o efeito do comprimento da cadeia *N*-alquílica, e sobre o efeito electroatractor do substituinte  $\text{X}=\text{Cl}$  ou  $\text{CF}_3$  na posição 7 do anel quinolínico.

Tabela 2 – Padrão de fragmentação de 40-51 no espectrómetro de massa com analisador QIT



Composto	R	X	[M+H] <sup>+</sup>	Fonte ESI SP (V)		Armadilha de Iões- FA (Fragmentation Amplitude)		
				107,1 – 171,3	187,3 – 251,5	0,1 – 0,5	0,6 – 1,0	1,1-1,2
40	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Cl	m/z 359	[M+H] <sup>+</sup>	[(M+H)–C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>	[M+H] <sup>+</sup>	[(M+H)–C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>	[(M+H)–C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> , Cl] <sup>+</sup>
41		CF <sub>3</sub>	m/z 393	[M+H] <sup>+</sup>			[(M+H)–C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>	
						0,1-0,6		0,7 – 1,2
42		Cl	m/z 430	[M+H] <sup>+</sup>		[M+H] <sup>+</sup>		[(M+H)–330] <sup>+</sup>
43		CF <sub>3</sub>	m/z 464			[M+H] <sup>+</sup>		
44		Cl	m/z 456	[M+H] <sup>+</sup>	[(M+H)–330] <sup>+</sup>	[M+H] <sup>+</sup>		[(M+H)–330] <sup>+</sup>
45		CF <sub>3</sub>	m/z 490	[M+H] <sup>+</sup>		[M+H] <sup>+</sup>		
46		Cl	m/z 458	[M+H] <sup>+</sup>	[(M+H)–330] <sup>+</sup>	[M+H] <sup>+</sup>		[(M+H)–330] <sup>+</sup>
47		CF <sub>3</sub>	m/z 492	[M+H] <sup>+</sup>		[M+H] <sup>+</sup>		
48		Cl	m/z 428	[M+H] <sup>+</sup>		[M+H] <sup>+</sup>		
49		CF <sub>3</sub>	m/z 462			[M+H] <sup>+</sup>		
50		Cl	m/z 444	[M+H] <sup>+</sup>		[M+H] <sup>+</sup>		[(M+H)–330] <sup>+</sup>
51		CF <sub>3</sub>	m/z 492			[M+H] <sup>+</sup>		

A hipótese da ativação sequencial em instrumentos equipados com células de colisão do tipo QQQ é perfeitamente viável e no presente estudo é confirmada pela redução da abundância dos iões das moléculas protonadas e o consequente aumento da abundância dos iões produto.

Os mecanismos de fragmentação propostos permitiram estabelecer a estrutura dos fragmentos obtidos a partir das moléculas protonadas, tendo em conta os prováveis locais de protonação, neste caso particular o azoto (N) da imina para todos os derivados das quinolon-4(1H)-iminas.

## 2.2 – Avaliação da Estabilidade Metabólica

Com o objetivo de prever a estabilidade dos compostos **40-51** (figura 30) nos microsomas, foram efetuados estudos de estabilidade metabólica em homogenatos de fígado de rato a 37°C, de acordo com as condições de ensaio descritas no capítulo da Parte Experimental 5.1.2.

A avaliação da atividade enzimática dos microsomas, declarada pelo fabricante, assim como a otimização das condições analíticas, foram previamente determinadas por métodos espectrofotométricos UV/VIS e de acordo com o descrito em 5.1.2.1.2.[162]

O decréscimo da área dos picos dos compostos em função do tempo foi observado e monitorizado por cromatografia líquido-líquido de alta resolução (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*). As condições de ensaio encontram-se referidas em 5.1.2.1.4.

A estabilidade, em tampão fosfato isotónico pH 7,4 foi avaliada como experiência de controlo, com o objetivo de assegurar a não existência de outros fatores que pudessem contribuir para a metabolização dos compostos nos microsomas de fígado de rato. (5.1.2.1.3)

No presente estudo, a avaliação da estabilidade nos microsomas, foi efetuada de duas formas:

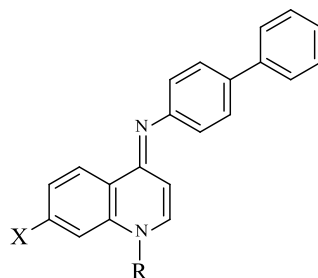
1. Em condições de pseudo-primeira ordem, para os compostos **40** e **41** cuja metabolização foi observada em tempo inferior ou igual a 4 horas. Neste caso foram determinadas as constantes de velocidade da reação  $K_{obs}$  e os tempos de semi-vida  $t_{1/2}$ .

2. Para os compostos **42-51** relativamente mais estáveis foi determinada a quantidade percentual de composto remanescente, após o período de 6h de incubação.

## **2.2.1 – Resultados e Discussão**

### **2.2.1.1 – Otimização das Condições Cromatográficas por HPLC**

A otimização das condições cromatográficas (5.1.2.1.4) com vista à obtenção de picos correspondentes aos compostos, com uma resolução adequada e tempos de análise reduzidos, foi obtida por variação da composição da fase móvel e do pH da solução tampão. A composição do eluente usado para cada composto, assim como os tempos de retenção obtidos são apresentados na tabela 3

Tabela 3 – Parâmetros otimizados por HPLC usados para a determinação da estabilidade metabólica de **40-51**

COMPOSTOS	R	X	Fase móvel (mL) ACN:H <sub>2</sub> O:tampão fosfato*	Tempo de retenção (min)
<b>40</b>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Cl	35:60:5	17,01
<b>41</b>		CF <sub>3</sub>	35:60:5	13,65
<b>42</b>		Cl	40:55:5	4,91
<b>43</b>		CF <sub>3</sub>	30:65:5	4,57
<b>44</b>		Cl	35:60:5	6,23
<b>45</b>		CF <sub>3</sub>	21:74:5	9,37
<b>46</b>		Cl	35:60:5	5,48
<b>47</b>		CF <sub>3</sub>	40:55:5	4,37
<b>48</b>		Cl	35:60:5	5,40
<b>49</b>		CF <sub>3</sub>	21:74:5	4,98
<b>50</b>		Cl	21:74:5	5,58
<b>51</b>		CF <sub>3</sub>	35:60:5	11,7

\*pH=3,1

### 2.2.1.2 - Avaliação da Atividade Enzimática nos Microsomas de Fígado de Rato

A avaliação da atividade enzimática dos microsomas indicada pelo fabricante foi determinada através da medição da atividade da enzima CYP2E1. A quantificação do produto formado foi efetuada com base na curva de calibração do padrão *p*-nitrocatecol, com concentrações de 1, 2, 5, 10 e 20nM.[162]

A curva de calibração, apresentada a título de exemplo na figura 39, foi traçada para cada lote novo de enzimas adquirido.

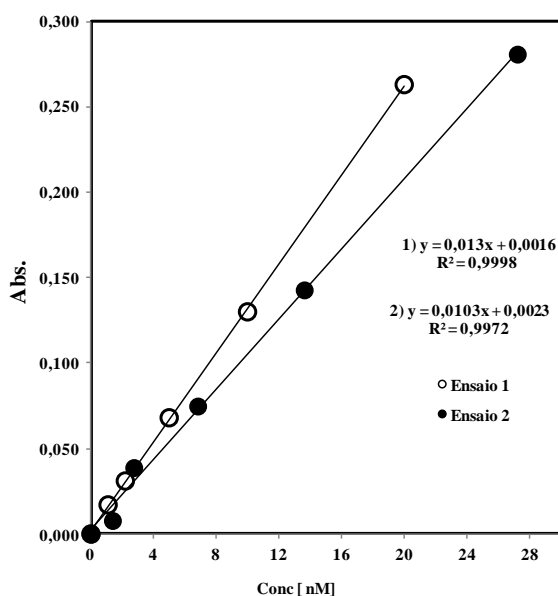


Figura 39 – Traçado da reta de calibração, que correlaciona a absorvência em função da concentração do padrão *p*-nitrocatecol

A atividade da enzima *p*-nitrofenol hidroxilase, expressa em pmol/(min.mg) foi determinada pela quantificação da hidroxilação do *p*-nitrofenol.

Os valores experimentais da atividade (tabela 4) obtidos para esta enzima estiveram sempre em conformidade com as especificações do fabricante [limites:  $\geq 880$  pmol/(mg×min)]

Tabela 4 – Valores de atividade experimental obtidos para a enzima CYP2E1

Ensaio	Absorvência	Conc. [pmol/(min.mg)]	Limites
1	0,057	1290	≥ 880 pmol/min.mg
	0,062	1406	
2	0,051	1181	
	0,052	1206	

### 2.2.1.3 - Avaliação da Estabilidade em Tampão Fosfato

Os ensaios de estabilidade em tampão fosfato isotônico (PBS) pH=7,4 a 37°C, serviram de experiência de controle e foram fundamentais, pois permitiram avaliar a estabilidade dos compostos em condições fisiológicas (ver 5.1.2.1.3)

A análise do valor das áreas cromatográficas permitiu constatar que as mesmas mantiveram-se constantes durante o período do ensaio, levando a concluir que não se observou a ocorrência de nenhum fenômeno que pudesse contribuir para a metabolização dos compostos na ausência de sistemas de regeneração.

### 2.2.1.4 - Avaliação da Estabilidade nos Microsomas de Fígado de Rato

Para a determinação da estabilidade metabólica as soluções dos compostos em estudo, descritas na parte experimental 5.1.2.3.4, foram colocadas na presença dos microsomas de fígado de rato e do sistema gerador de NADPH em PBS, a 37°C. A variação da concentração dos compostos foi analisada por HPLC-UV em ensaios triplicados.

Para os compostos **40** e **41** ( $R = C_2H_5$ ,  $X = Cl$  e  $CF_3$  respectivamente) os valores das constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem ( $k_{obs}$ ) foram determinados a partir do gráfico  $\ln(\text{área})$  (figura 40) em função do tempo, correspondendo esta grandeza ao declive das respectivas retas.



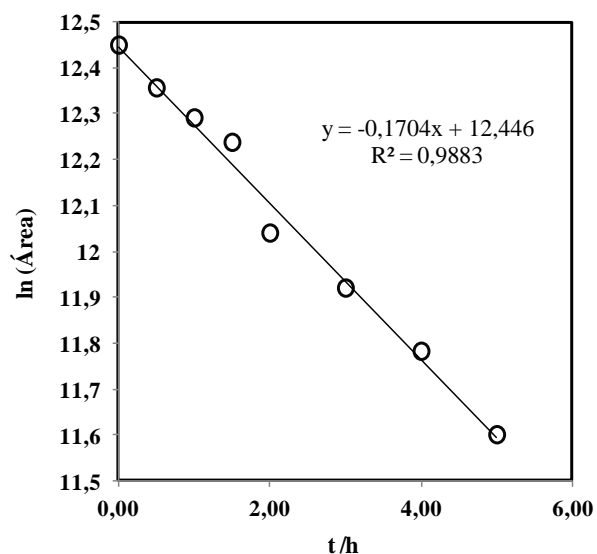


Figura 40 - Correlação entre o ln (Área) em função do tempo para a metabolização do composto **40** em enzimas hepáticas, a 37°C.

Por aplicação da equação 2, determinou-se o tempo de semivida  $t_{1/2}$  de cada composto.

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{\text{obs}}}$$

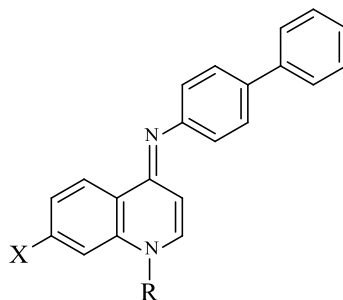
Equação 2 - Equação aplicada para o cálculo do tempo de meia vida  $t_{1/2}$  dos compostos

O procedimento experimental detalhado para a avaliação da estabilidade nos microsomas de fígado de ratos encontra-se descrito no capítulo da Parte Experimental 5.1.2.1.4

A avaliação dos resultados baseou-se na observação da redução da concentração do pico correspondente ao substrato, ao longo do tempo. Nas condições em que se verificou o decréscimo da concentração não foi visualizado o surgimento de um outro pico correspondente a um presumível metabolito.

A média das constantes de velocidade, e os tempos de semi-vida ( $t_{1/2}$ ) obtidos para os compostos **40** e **41** estão representados na tabela 5.

Tabela 5 – Valores de  $k_{obs}$  e  $t_{1/2}$  obtidos após a avaliação da estabilidade metabólica dos compostos **40** e **41**



COMPOSTOS	R	X	$k_{obs} (h^{-1})$	$t_{1/2} (h)$
<b>40</b>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	Cl	0,1704	4,0
<b>41</b>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	CF <sub>3</sub>	0,1598	4,2

Para os compostos **42-51**, que apresentam *N*-alquilaminas na posição R e que se revelaram, muito mais estáveis, os dados na tabela 6 apresentam a percentagem de composto remanescente após 6h de incubação.

Tabela 6- Percentagem remanescente após 6h de incubação em homogenato de fígado de rato, a 37°C calculada para os compostos **42–51**

Composto	R	X	% Remanescente
<b>42</b>		Cl	76,0
<b>43</b>		CF <sub>3</sub>	80,4
<b>44</b>		Cl	62,5
<b>45</b>		CF <sub>3</sub>	65,0
<b>46</b>		Cl	78,7
<b>47</b>		CF <sub>3</sub>	81,5
<b>48</b>		Cl	ND
<b>49</b>		CF <sub>3</sub>	79,0
<b>50</b>		Cl	65,0
<b>51</b>		CF <sub>3</sub>	68,2

ND - não determinada

De um modo geral pode-se concluir que a metabolização dos derivados *N*-alquílicos, **40** e **41**, ocorre 4h após a sua incubação em microsomas de fígado de rato.

Os dados da tabela 6 mostram que as *N*-alquilaminas derivadas das quinolon-4(1H)-iminas **42-51** exibem elevada estabilidade metabólica, com a maioria dos compostos apresentando uma metabolização insignificante depois de 6 horas de incubação.

Estes resultados também sugerem que a percentagem de metabolização não é

significativamente afetada pelo comprimento da cadeia aminoalquílica, segundo os resultados respetivos aos compostos **43** e **47**, ou pela natureza dos substituintes no anel quinolínico, conforme os dados obtidos para os compostos **46** e **47**. Um resultado semelhante foi observado quando as amins acíclicas terminais, por ex. no composto **43**, foram substituídas por amins cíclicas, originando o composto **49**.

Nenhum dos compostos selecionados mostrou qualquer alteração nas experiências de controlo – estabilidade em tampão fosfato (com o sistema de regeneração ausente NADPH), sugerindo a não ocorrência de metabolismo, dependente de não cofatores, que pudesse interferir na sua metabolização em microssomas de fígado de rato.

## 2.3 – Detecção e Identificação de Metabolitos

A cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) é uma das principais técnicas utilizadas na análise de compostos não voláteis e/ou termicamente instáveis. Sendo uma excelente técnica de separação e de elevada seletividade, ela precisa de ser acoplada a uma outra técnica que forneça as informações estruturais necessárias para a confirmação da identidade dos compostos orgânicos, presentes em quantidades mínimas em matrizes complexas. De entre as várias opções existentes, a espectrometria de massa (MS) é a técnica analítica de grande potencial que possibilita não só a obtenção da informação estrutural mas também o aumento adicional da seletividade.[72]

O acoplamento entre estas duas técnicas dá origem a uma ferramenta analítica versátil e de grande potencial na análise qualitativa e quantitativa: a LC-MS

A LC-MS combina a capacidade de separação física da cromatografia líquida com a capacidade de análise da espectrometria de massa: enquanto a coluna separa em função do tempo a maior parte dos compostos de uma mistura, o MS ioniza as moléculas desses compostos e separa-os de acordo com a razão  $m/z$ . Adicionalmente, o sistema LC-MS/MS possibilita a fragmentação do ião precursor com um determinado padrão de fragmentação e separa os iões produto resultantes para identificação e quantificação.

As técnicas de ionização à pressão atmosférica são geralmente empregues uma vez que apresentam a capacidade de combinar duas características num mesmo sistema: facilitar a transferência da amostra que sai da coluna para a fase gasosa e a ionização da

amostra. De entre elas a ESI é o modo de ionização que mostrou melhor desempenho para analitos de elevada massa molecular e ou de elevada polaridade e baixa estabilidade térmica.

Tirando vantagens das inúmeras aplicações do acoplamento LC-MS, no presente estudo o uso desta técnica teve por finalidade a detecção e identificação de possíveis metabolitos, resultantes da metabolização dos compostos em microsomas de fígado de rato.

### 2.3.1 - Discussão dos Resultados

Para este estudo, foram selecionados os compostos **40** e **41** que apresentam valores de semi-vida de 4h e o composto **44** por apresentar de entre as quinolimas *N*-alquiladas a menor quantidade de composto remanescente após 6h de incubação (62,5%) (tabela 6).

As soluções dos compostos, usadas para a pesquisa de metabolitos, foram as misturas de incubação em microsomas, nos tempos  $t_{0h}$ ,  $t_{6h}$  e  $t_{24h}$ , preparadas pelo procedimento descrito na Parte Experimental 5.1.2.3 para a avaliação da estabilidade metabólica.

Como ponto de partida para a pesquisa de massas, foi para cada composto, elaborada uma árvore de possíveis metabolitos.

A pesquisa e detecção de metabolitos foi efetuada nas amostras em que foi observado o aparecimento de novos picos. A análise baseou-se na comparação dos cromatogramas obtidos por varrimento (MS Scan); na avaliação do perfil de absorção dos compostos e na monitorização seletiva de iões (SIM - Single Ion Monitoring).

A identidade dos metabolitos formados foi confirmada com base nas semelhanças do perfil de fragmentação dos compostos detetados com o das moléculas precursoras.

#### 2.3.1.1 – Identificação Estrutural dos Metabolitos do Composto 40

A análise, por LC-MS da solução padrão do composto **40** em ACN resultou na detecção de um pico com o tempo de retenção  $t_r=6,60$  min, respetivo à eluição da molécula protonada  $[M+H]^+$   $m/z$  359. O espectro de massa obtido e ilustrado na figura 41B, corresponde à caracterização estrutural do composto, que possui na sua

composição um átomo de cloro, cuja razão de massas isotópicas é característica ( $^{35}\text{Cl}:$  $^{37}\text{Cl}= 3:1$ ).

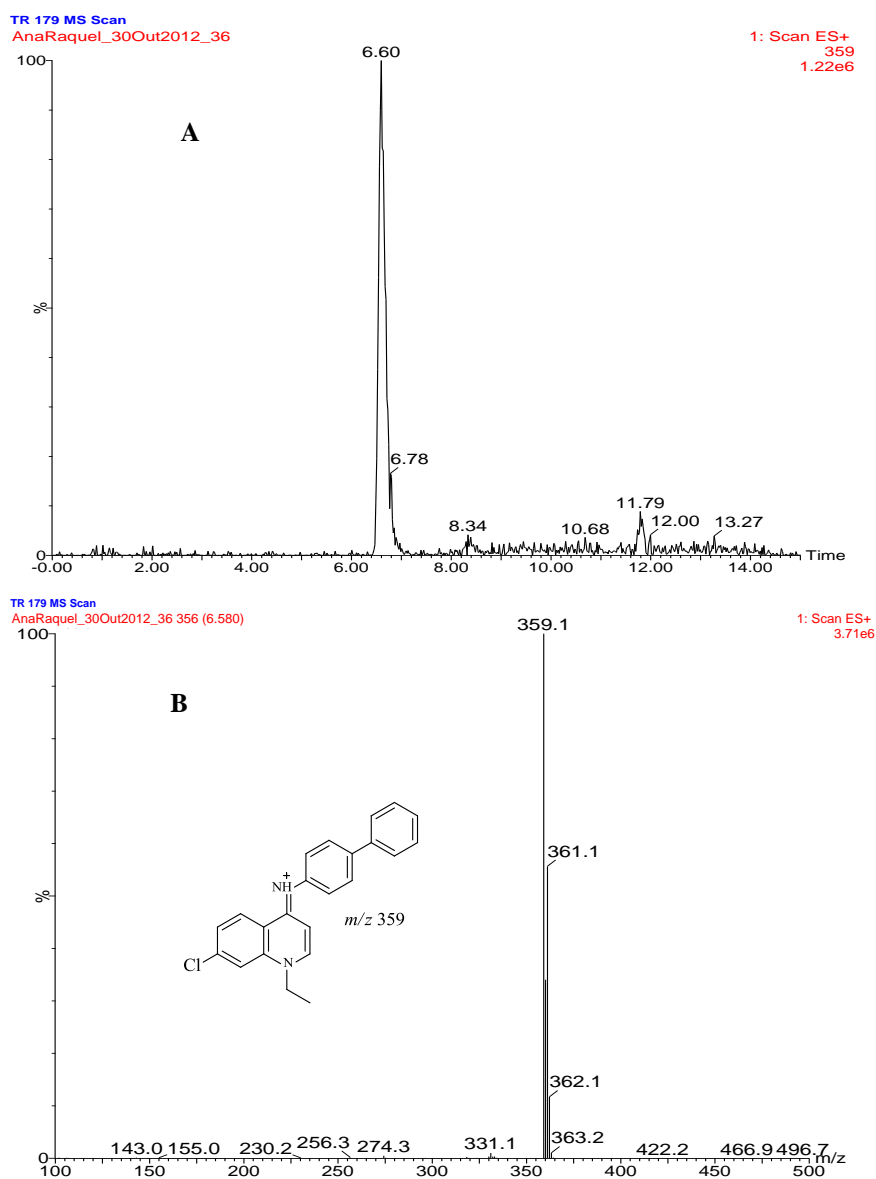


Figura 41 – A) Cromatograma e B) Espectro de massa do ião extraído  $m/z$  359 da molécula protonada do composto **40** com  $t_r = 6,60$  min

O mesmo procedimento foi empregue para a análise da solução da 4-quinolimina, possível metabolito resultante da *N*-desalquilação. Os resultados obtidos e ilustrados na figura 42, confirmam a eluição da amostra padrão correspondente a molécula ionizada deste composto  $[(M+H)-28]^+$   $m/z$  331, aos 6,28min. O espectro de massa apresenta um pico também com a razão de massas isotópicas dos átomos de cloro.

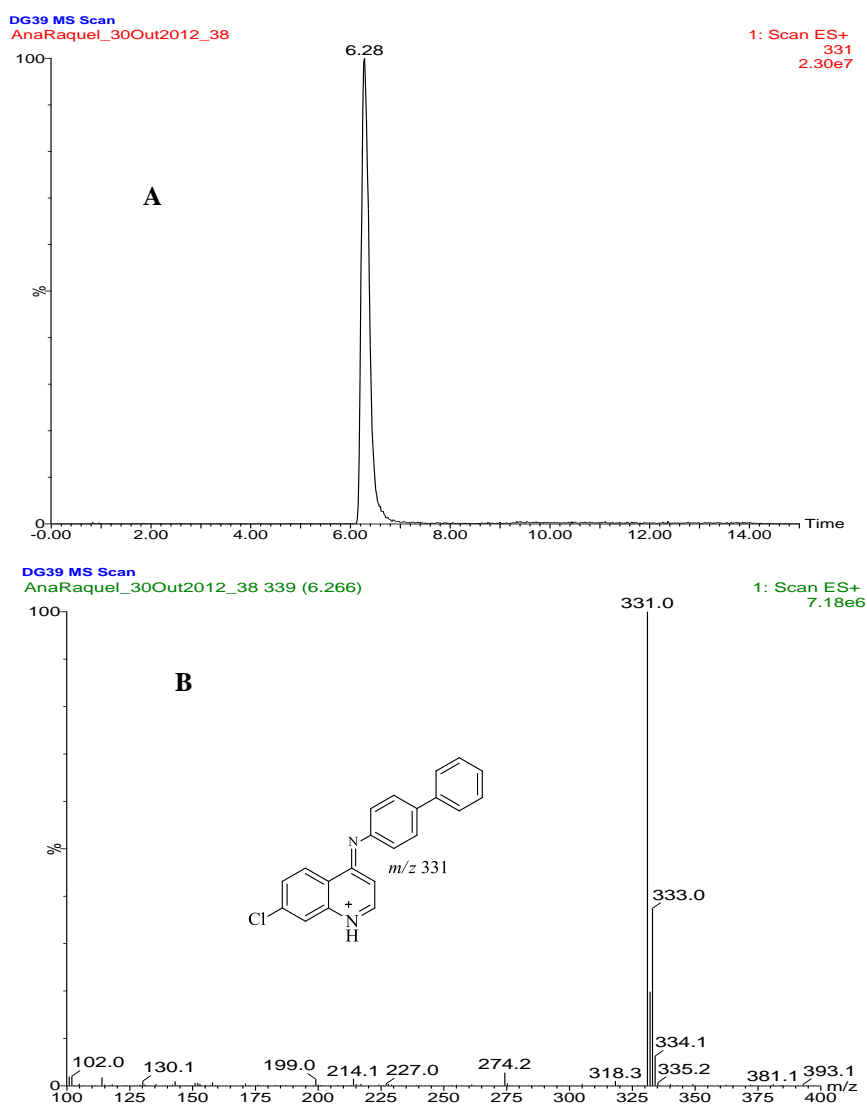
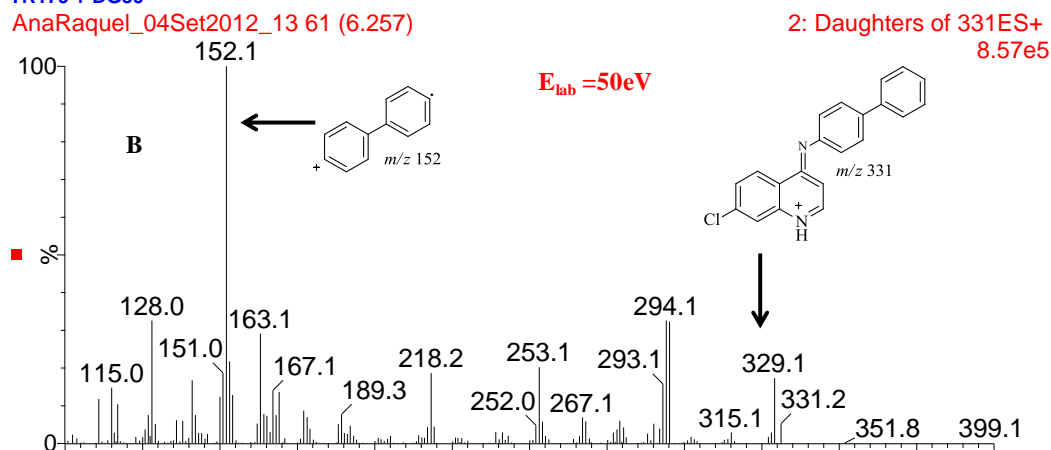


Figura 42 - A) Cromatograma e B) Espectro de massa da molécula protonada de  $m/z$  331 com  $t_r=6,28$  min

Os resultados da análise por LC-MS/MS a que a molécula ionizada  $[M+H]^+$   $m/z$  339 foi submetida, indicam a formação do ião fragmento,  $m/z$  331, a valores de energias de colisão de 35eV, resultante da perda de 28 Da,  $[(M+H)-28]^+$  atribuídos à saída do grupo  $C_2H_4$ . O espectro de massa correspondente à formação desse ião produto é mostrado na figura 43A. A energia de colisão foi aplicada a valores de 50eV, originando o ião produto de maior intensidade,  $m/z$  152, a partir de  $m/z$  331 (figura 43B).

TR179 + DG39

AnaRaquel\_04Set2012\_13 61 (6.257)



AnaRaquel\_04Set2012\_13 70 (6.571)

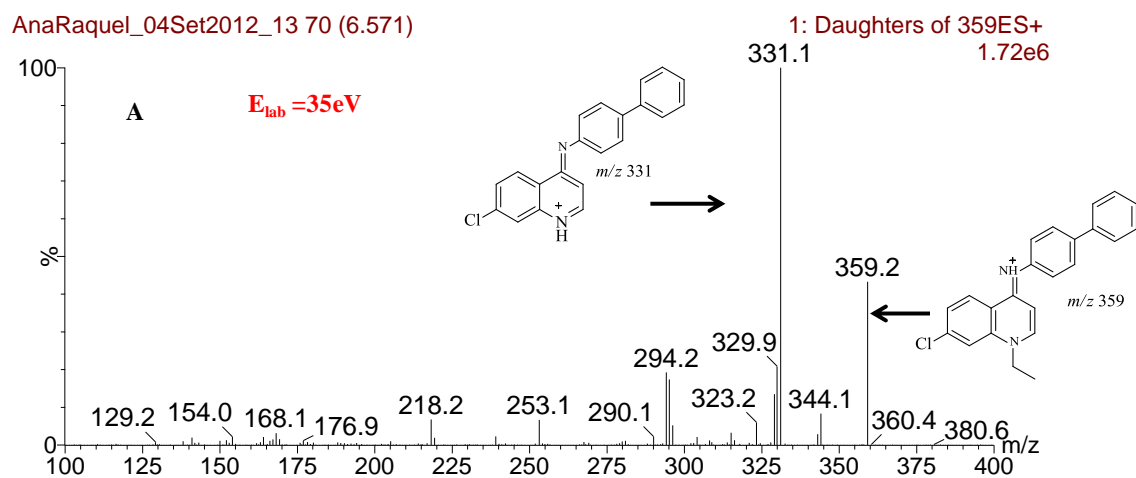


Figura 43 – Espectros de MS/MS A) de  $[M+H]^+$   $m/z$  359 obtido por aplicação de uma energia de colisão de 35eV B) de  $m/z$  331 obtido por aplicação de uma energia de colisão de 50eV

As condições, otimizadas para a fragmentação, foram usadas para a detecção seletiva, por MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas) de ambos os compostos nas misturas reacionais  $t_{0h}$ ,  $t_{6h}$  e  $t_{24h}$ . (ver figura 44).



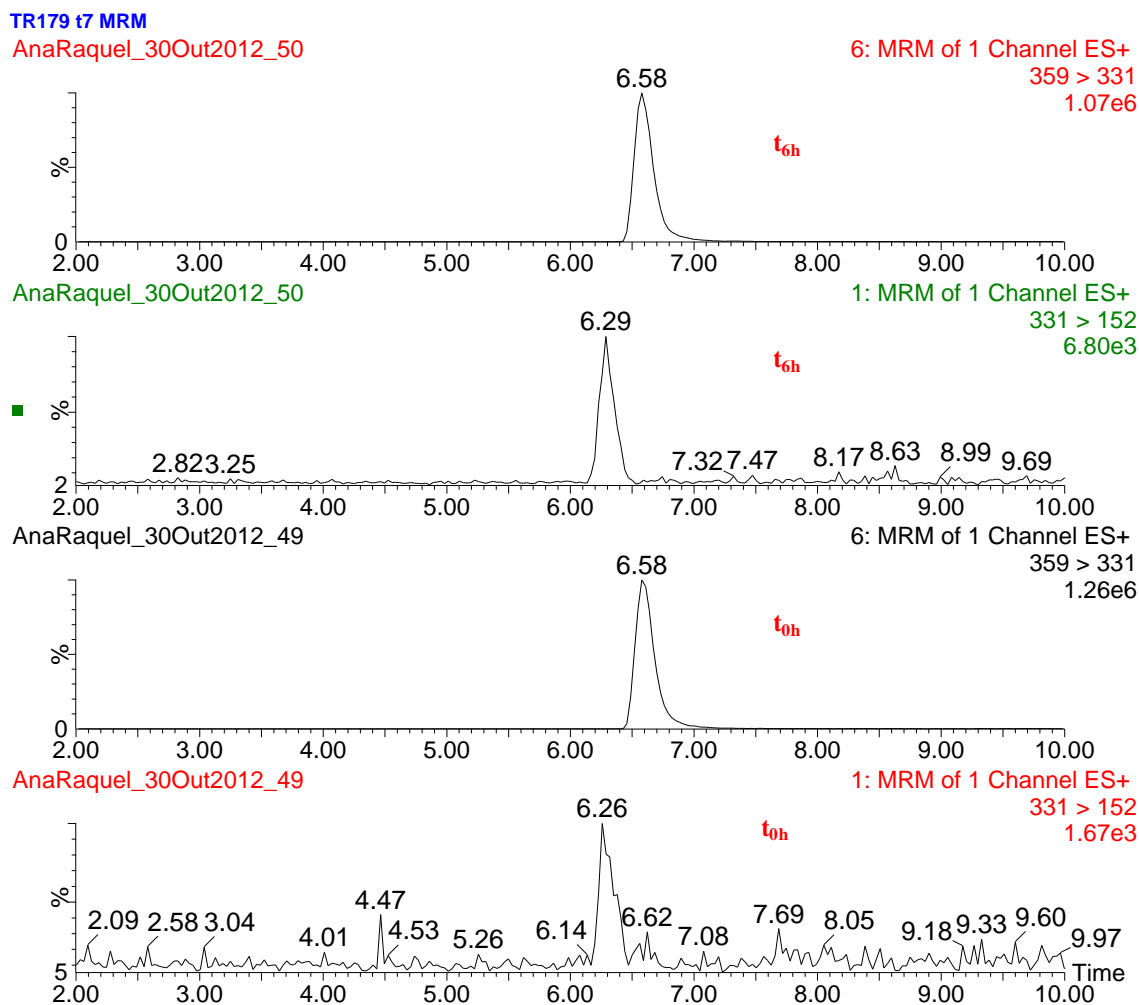


Figura 44 - Cromatogramas MRM da molécula protonada do composto **40** (359> 331) e do possível metabolito (331> 152) nos  $t_{0h}$  e  $t_{6h}$

A avaliação dos cromatogramas na figura 44 permitiu observar no tempo  $t_{0h}$  um pico com o mesmo tempo de retenção do metabolito,  $t_r=6,28$  min, cuja presença não foi detetada na solução do composto, nem no ACN e nem nos microssomas. Os cromatogramas obtidos após a análise das alíquotas  $t_{6h}$  e  $t_{24h}$  confirmam também a presença do mesmo pico, mas com um sinal de intensidade cerca de 4 vezes maior, após as 24h. Estes resultados foram consistentes na condução dos ensaios em duplicado.

Com o objetivo de possibilitar a deteção de outros metabolitos o tempo de análise foi alterado de 15 para 30 min (5.1.2.1.3). Sob estas condições, a molécula protonada  $m/z$  359 foi detetada ao  $t_r=10,55$  min.

A pesquisa de outros metabolitos baseou-se na análise comparativa do cromatograma das alíquotas  $t_{6h}$  e  $t_{24h}$  obtido ao comprimento de onda de 265nm, assim como do cromatograma dos iões extraídos  $m/z$  359 e 375. Os resultados obtidos

mostram na figura 45, que paralelamente ao decréscimo da concentração do composto **40**  $m/z$  359, (<10% de intensidade no  $t_{24h}$ ), observa-se o aparecimento de um novo pico, na alíquota do  $t_{6h}$ , com o tempo de retenção de 8,59 min. Na figura também são apresentados os cromatogramas correspondentes ao solvente (ACN) e aos microsossomas que confirmam a ausência de picos para os tempos de retenção de eluição do composto e do metabolito.

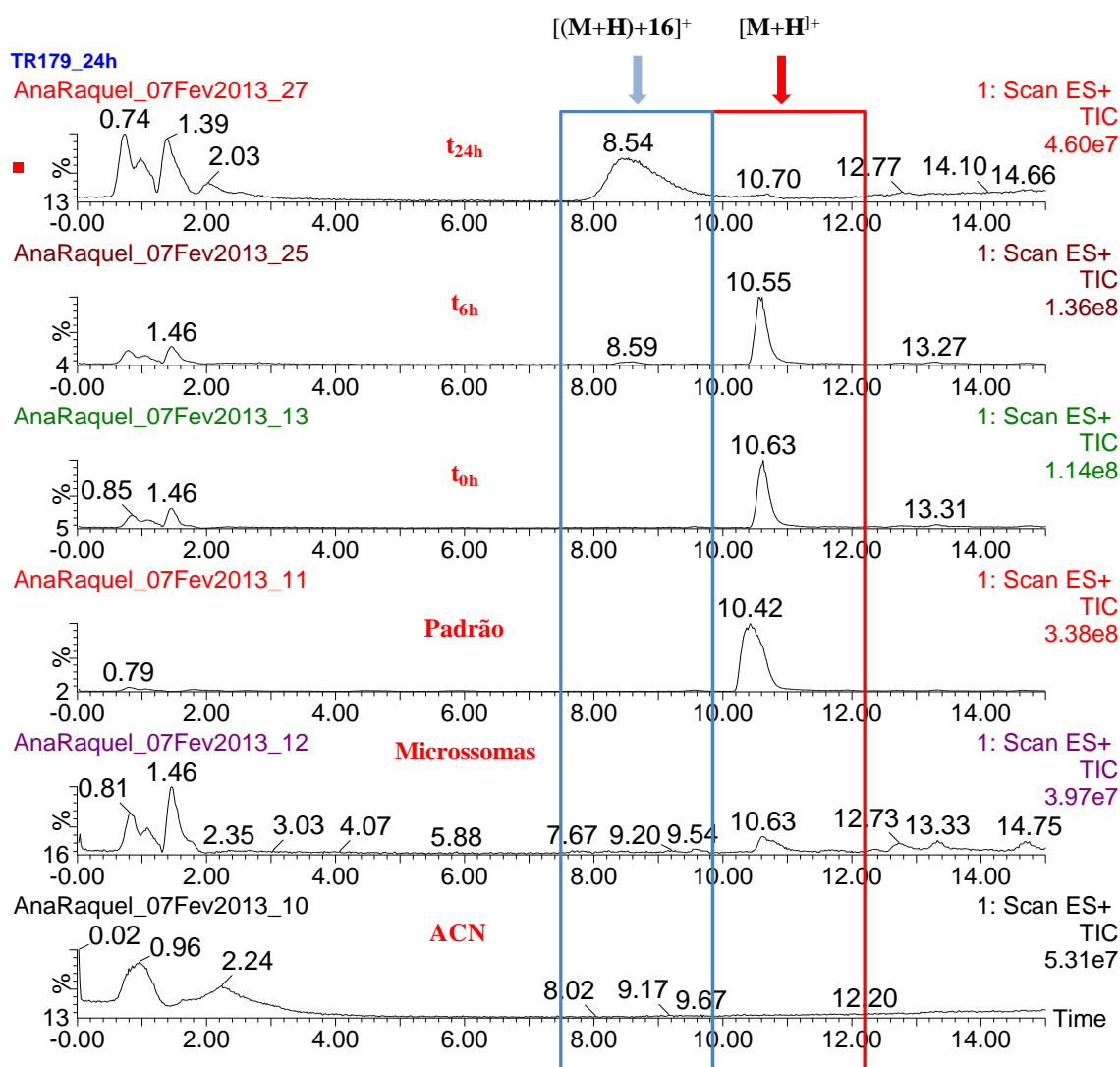


Figura 45 – Cromatogramas do ACN, microsossomas e da molécula protonada do composto 40, nas misturas reacionais dos tempos  $t_{0h}$ ,  $t_{6h}$  e  $t_{24h}$

Os espectros de massa referentes ao pico aos 8,65min mostram tratar-se de uma molécula protonada  $m/z$  375, com uma massa de 16 Da superior relativamente à massa da molécula ionizada **40**  $m/z$  359. Tal como no espectro de massa do composto em ACN, o pico  $m/z$  375 apresenta a razão de massas isotópicas correspondente ao cloro, o

que leva a presumir que se trate de um metabolito hidroxilado derivado de **40**, cuja estrutura é indicada na figura 46. Também a presença do grupo OH, que contribui para o aumento da polaridade, justifica um menor tempo de retenção deste composto.

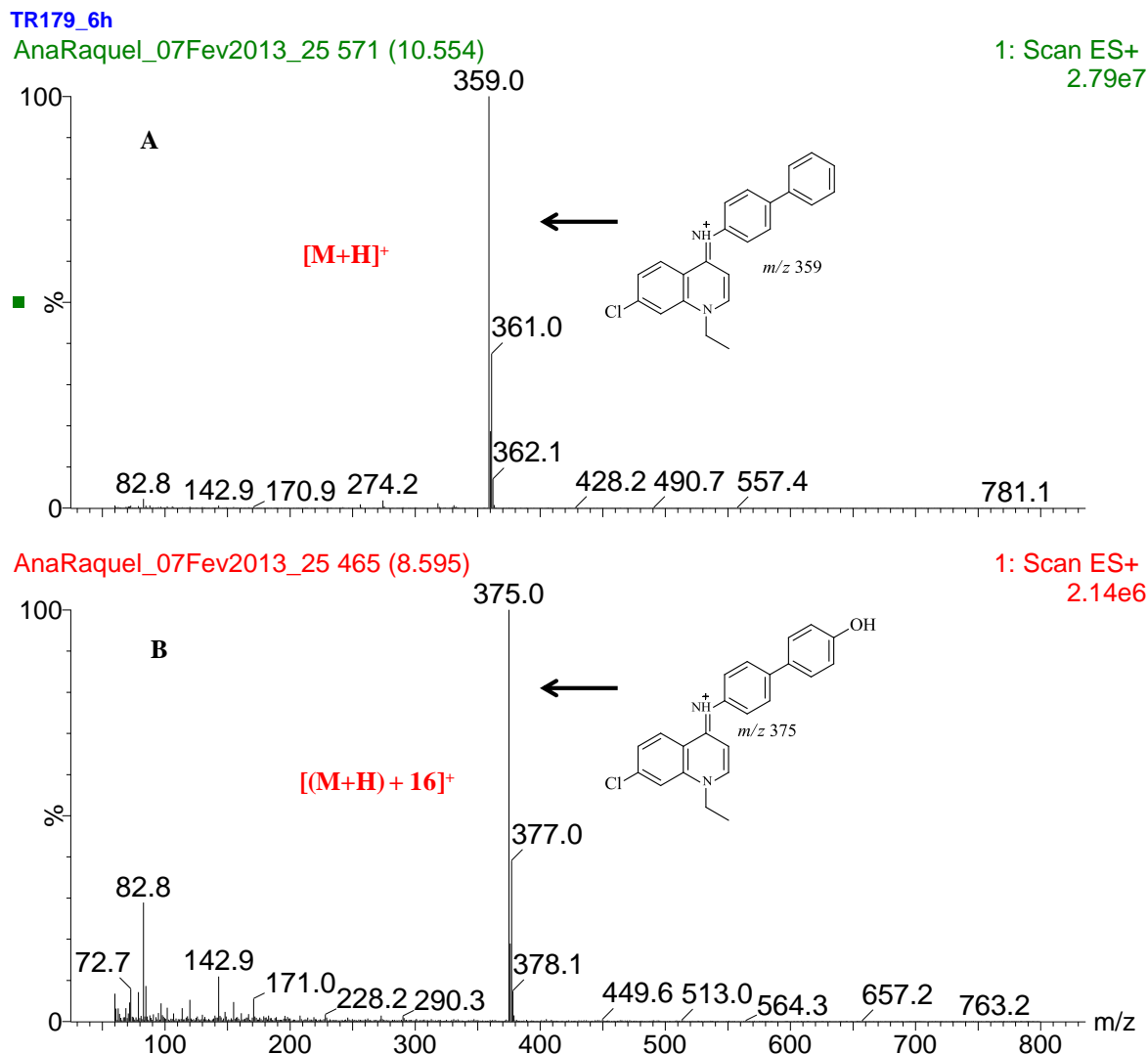


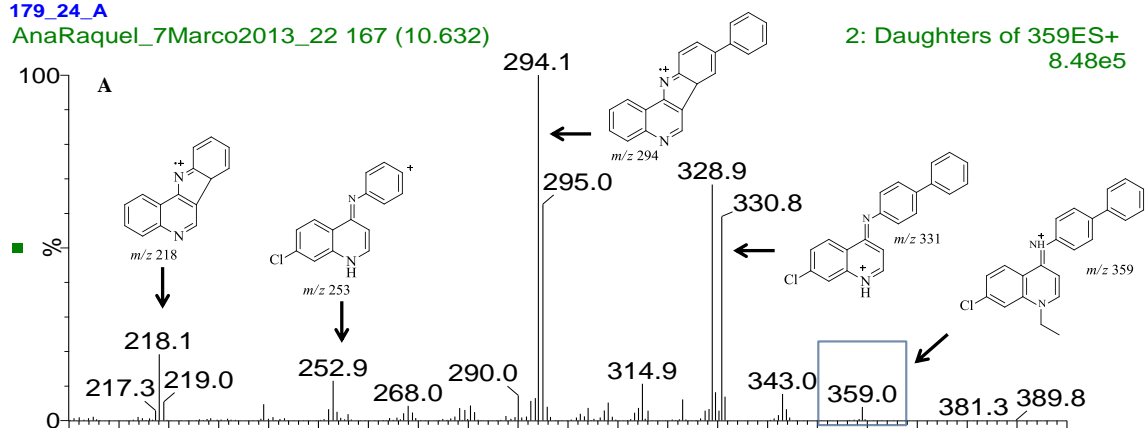
Figura 46 – Espectros de massa A) da molécula protonada de **40**  $m/z$  359 e B) do possível metabolito hidroxilado  $m/z$  375 na mistura reacional  $t_{6h}$

A presença do pico nas alíquotas  $t_{6h}$ , e  $t_{24h}$  também foi confirmada no cromatograma obtido ao comprimento de onda de 265nm.

O padrão de fragmentação deste ião hidroxilado a energias de 45eV é similar ao da molécula protonada do composto **40** e tal como se pode observar, na figura 47 também origina os fragmentos hidroxilados,  $[(M+H+16)-28]^+$   $m/z$  347 e  $[(M+H+16)-28-35]^+$   $m/z$  310, correspondentes respetivamente à perda inicial de 28 Da devido ao  $C_2H_4$  e de 37 Da devido ao Cl.

179\_24\_A

AnaRaquel\_7Marco2013\_22 167 (10.632)



AnaRaquel\_7Marco2013\_22 196 (8.681)

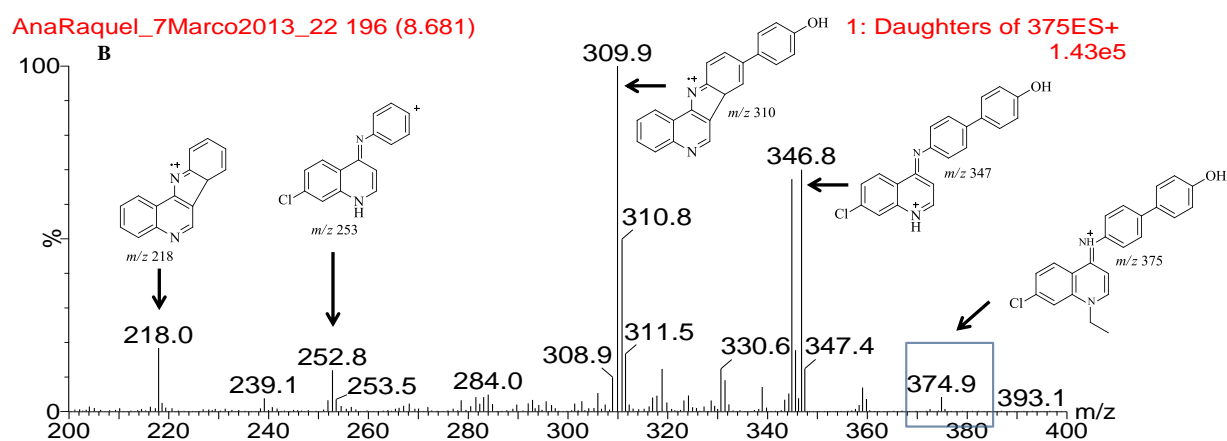


Figura 47 – Espectros de MS/MS A) da molécula protonada do composto **40** e B) do metabolito  $m/z$  375, obtidos a 45eV

Pelo modo de Monitorização Seletiva de Iões (SIM) foram adicionalmente pesquisados os iões  $m/z$  162, 178, 180, 329 346 e 357, apresentados na figura 48, que não foram detetados.

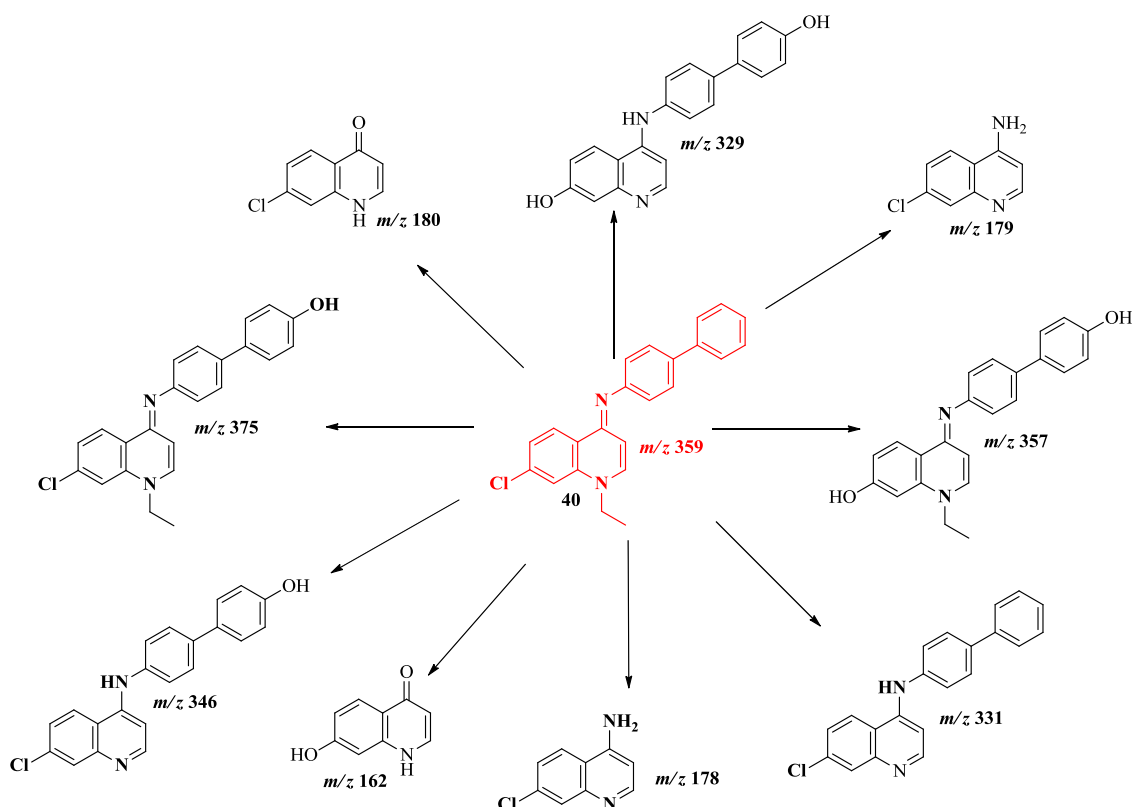


Figura 48 – Metabólitos suscetíveis de se formarem a partir da molécula protonada do composto **40** (adaptada da ref.[132])

Com base nas semelhanças dos padrões de fragmentação, os resultados obtidos permitiram indicar a formação de dois metabólitos  $m/z$  331 com o  $t_r=6,32\text{min}$  e  $m/z$  375 aos 8,59 min de análise, resultantes respetivamente da *N*-desalquilação e da hidroxilação de **40**.

### 2.3.1.2 – Identificação Estrutural dos Metabólitos do Composto **41**

O composto **41** difere estruturalmente do **40** por possuir  $\text{CF}_3$ , na posição 7 do anel quinolínico. A análise a este composto foi efetuada sob as mesmas condições descritas para o **40**. Os resultados obtidos mostram na figura 49A, que o composto **41** apresenta no cromatograma um pico com o  $t_r=6,70\text{min}$  e com um espectro de massa característico do composto (figura 49B).

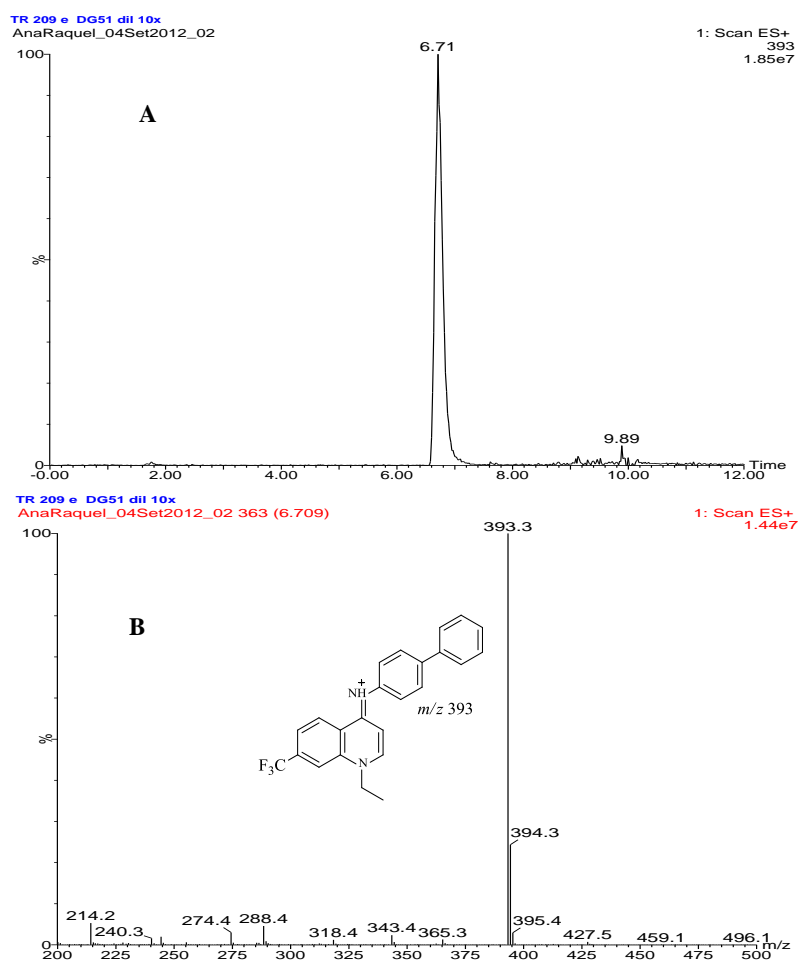


Figura 49 – A) Cromatograma e B) Espectro de massa da molécula protonada do composto **41** com o  $t_r=6,70$  min

A análise de uma solução do composto correspondente à *N*-desalquilação de **41** apresenta um pico aos 6,45 min, com um espectro de massa característico figura 50B.

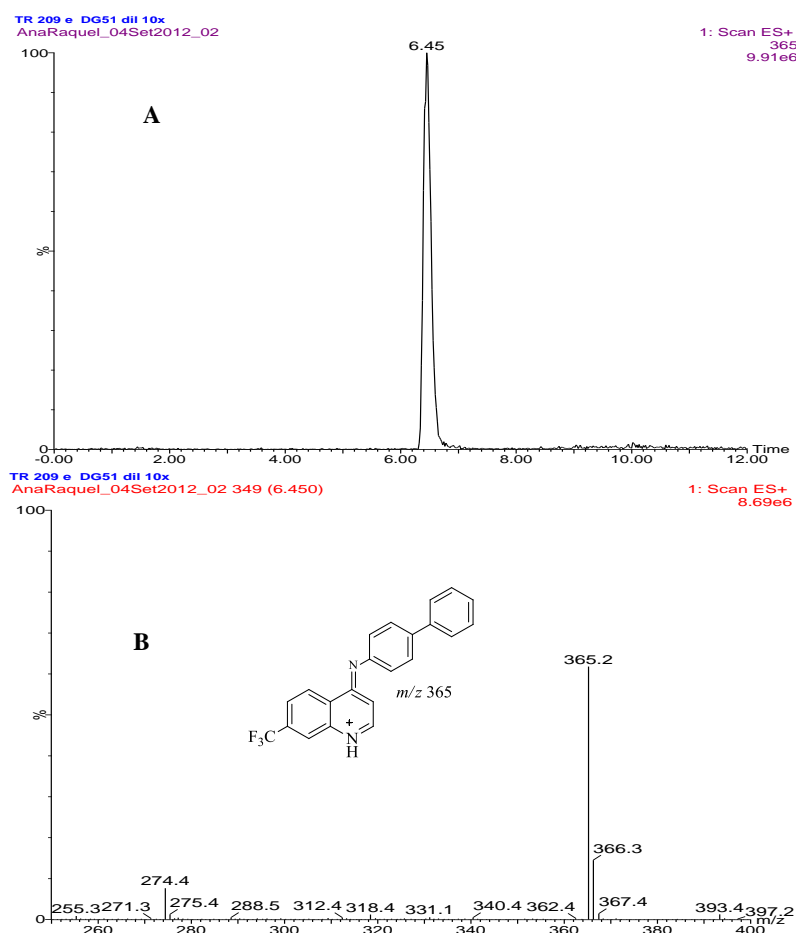


Figura 50 - A) Cromatograma e B) Espectro de massa da molécula protonada de  $m/z$  365 com  $t_r=6,45$  min

As energias de colisão de 35 e 50eV, otimizadas para a detecção de iões produtos a partir de  $m/z$  393 e de  $m/z$  365 respetivamente, permitiram estabelecer as transições 393>365 e 365>152 que foram utilizadas para a detecção de ambas as moléculas, no estudo da estabilidade metabólica (figura 51).

TR 209 t6

AnaRaquel\_05Set2012\_13

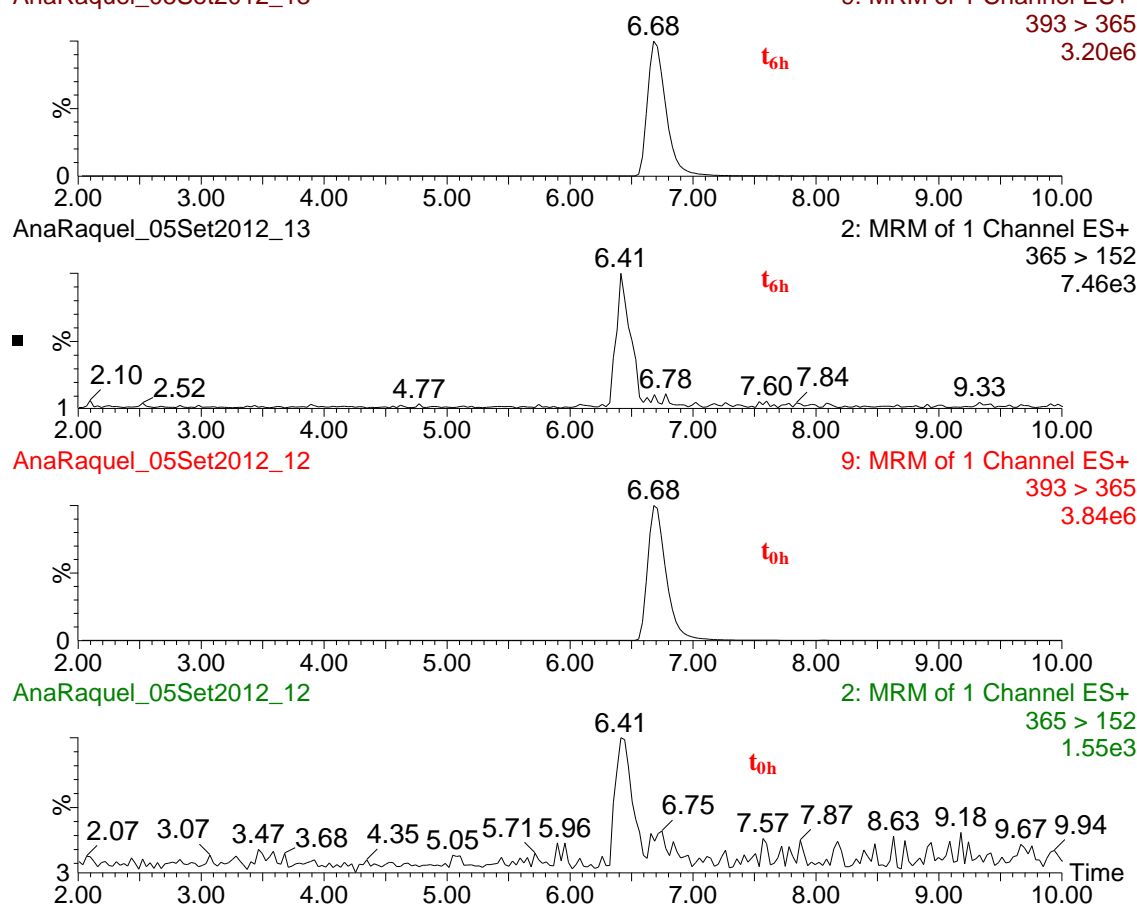


Figura 51 - Cromatogramas MRM da molécula protonada do composto **41** (393> 365) e do metabolito (365> 152) nos t<sub>0h</sub> e t<sub>6h</sub>

As análises efetuadas em duplicado, às misturas de incubação nos t<sub>0h</sub>, t<sub>6h</sub> e t<sub>24h</sub>, também mostram desde o início da incubação, um pico com o mesmo tempo de retenção do metabolito, cujo sinal vai aumentando de intensidade no decurso do ensaio, conforme ilustrado na figura 51.

Os resultados obtidos permitiram indicar a formação do metabolito  $m/z$  365 com o t<sub>r</sub>=6,41min resultante da N-desalquilação de **41**.

### 2.3.1.3 – Identificação Estrutural dos Metabolitos do Composto **44**

A metabolização do composto **44**, que possui um grupo N-alquilamina, foi avaliada através da determinação da quantidade percentual de composto remanescente, após 6h de incubação. A figura 52A mostra um pico com o t<sub>r</sub>=6,60 min que corresponde ao composto **44**, na solução padrão. A molécula protonada, de **44** [M+H]<sup>+</sup>  $m/z$  456



apresenta um espectro de massa na figura 52B concordante com a caracterização estrutural do composto, que possui na sua composição um átomo de cloro.

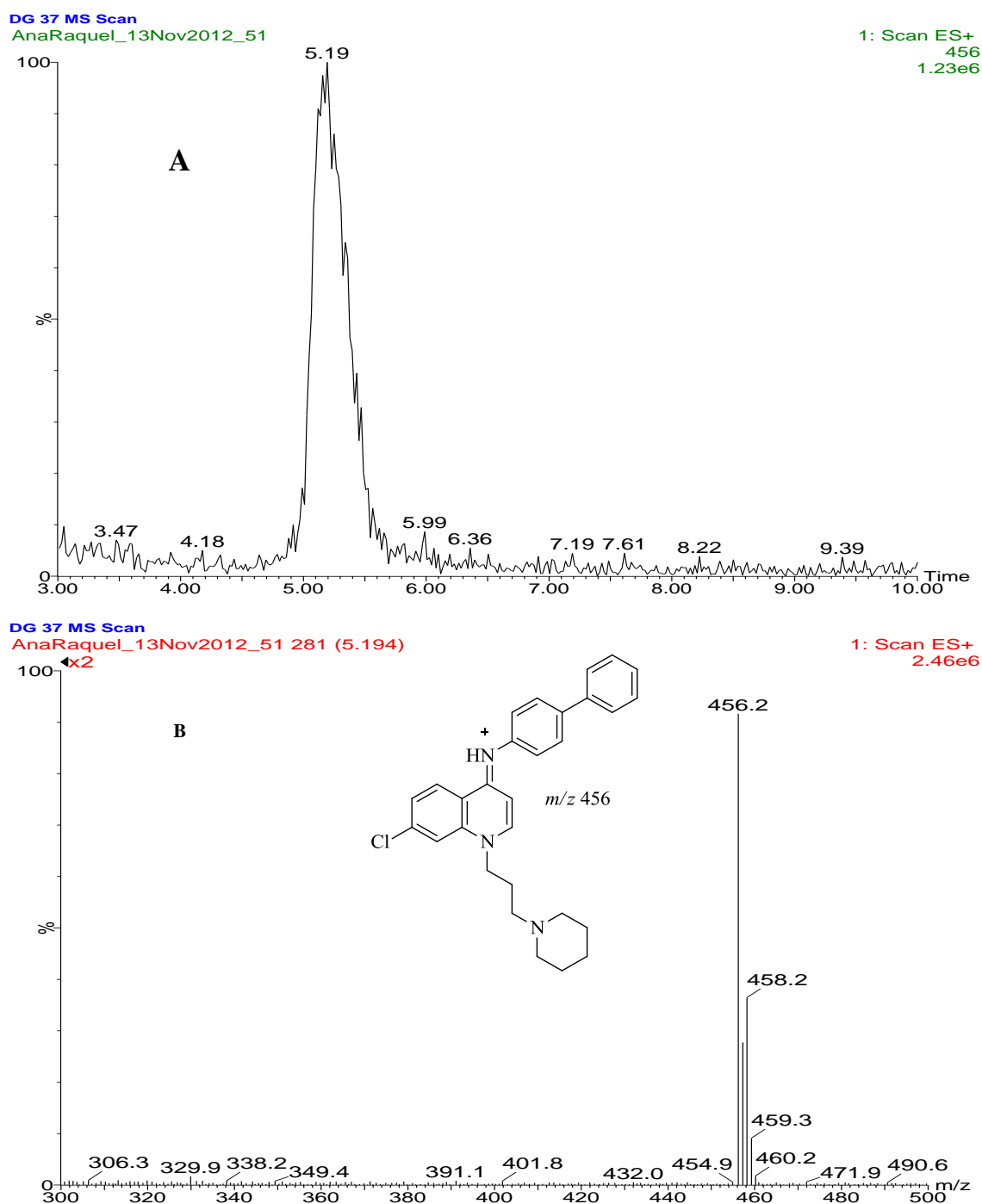


Figura 52 – A) Cromatograma e B) Espectro de massa da molécula protonada do composto **44** com o  $t_r=6,60\text{min}$

A análise da solução padrão da 4-quinolimina, possível metabolito resultante da *N*-desalquilação, confirma, tal como para o composto **40**, a eluição do composto

$[(M+H)-28]^+$   $m/z$  331, aos 6,28min (ver figura 42).

A pesquisa de  $m/z$  331, nas alíquotas  $t_{0h}$ ,  $t_{6h}$  e  $t_{24h}$  foi efetuada pelo método do ião extraído. A análise dos cromatogramas, apresentados na figura 53, permitiu observar que a intensidade do pico  $m/z$  331, reduziu para cerca de 43% durante as 24h de incubação. O composto  $m/z$  331 foi também detetado na solução do composto **44**, o que leva a pressupor que a presença do mesmo possa ser, possivelmente, devida ao facto de ser um produto de partida para a síntese de **44**.

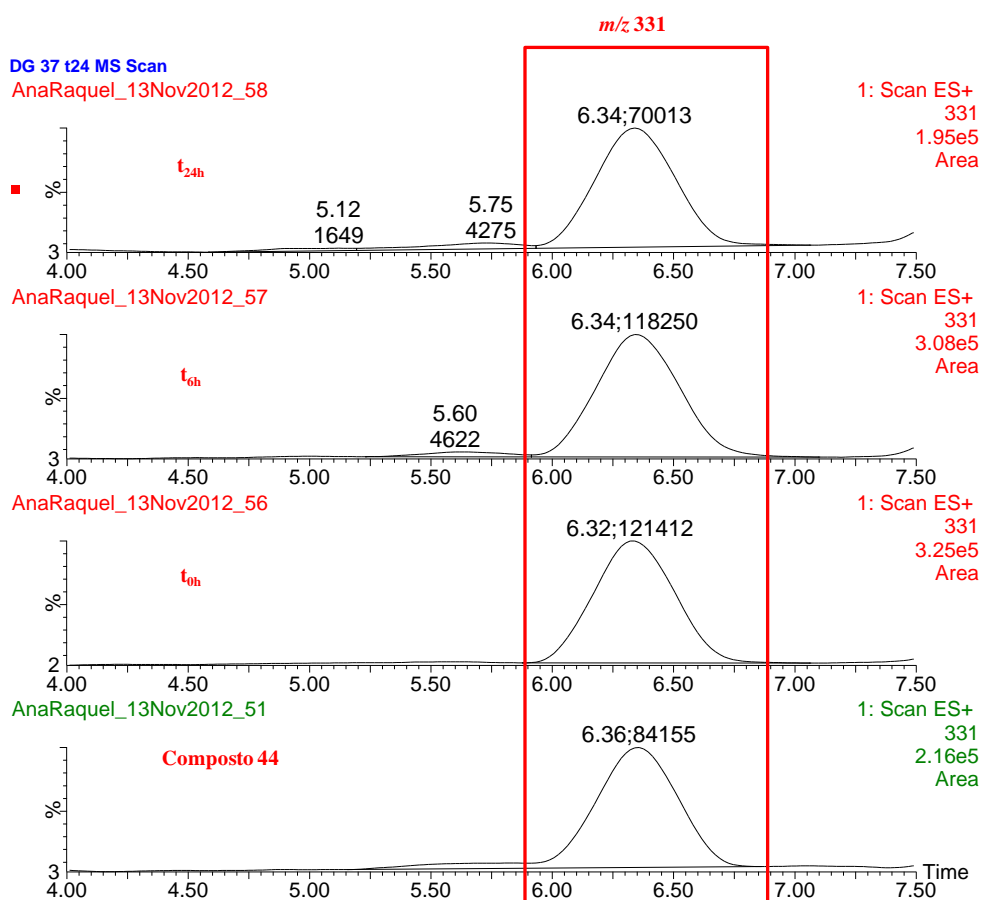


Figura 53 – Cromatograma da molécula protonada do composto **44** nas alíquotas  $t_{0h}$ ,  $t_{6h}$  e  $t_{24h}$

Estes resultados permitem concluir que o composto  $m/z$  331 não é, nas condições de ensaio empregues, um possível metabolito de **44**, uma vez que a presença do mesmo nas misturas reacionais analisadas não resulta da metabolização do composto

Tal como no caso do composto **41** o tempo de análise foi alterado de 15 para 30 min com o objetivo de permitir a deteção de outros possíveis metabolitos (5.1.2.1.3). Sob estas condições de análise, o composto **44**  $m/z$  456 foi detetado ao  $t_r=8,78$ min.

A análise do cromatograma obtido ao comprimento de onda de 265nm, assim

como o cromatograma dos iões extraídos  $m/z$  456 e 472 (figura 54), mostram, ao fim de 6h de ensaio, a formação de um pico novo ao  $t_r=8,1$  min com 12,75% de intensidade.

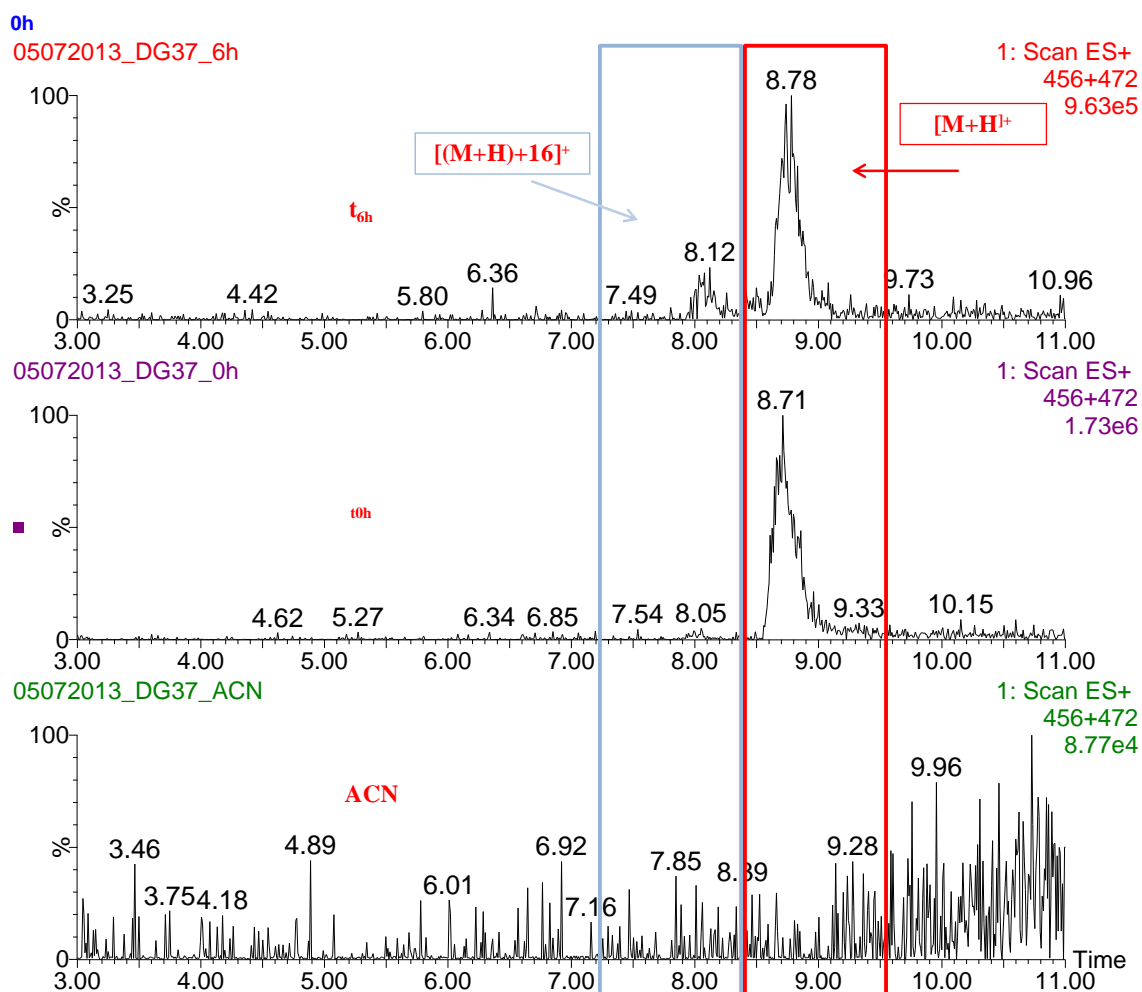


Figura 54 – Cromatogramas da molécula protonada do composto **44**, nas misturas reacionais dos tempos  $t_{0h}$  e  $t_{6h}$ .

O espectro de massa na figura 55 confirma que pico aos 8,12min corresponde à uma molécula protonada  $m/z$  472, com uma massa de 16 Da superior relativamente à massa da molécula ionizada **44**  $m/z$  456. Tal como no espectro de massa do composto **44**, o  $m/z$  472 apresenta a razão de massas isotópicas correspondente ao cloro, o que leva a presumir que se trate de um metabolito hidroxilado derivado de **44**, cuja estrutura é também indicada na figura 55. A presença do grupo OH, que contribui para o aumento da polaridade, justifica um menor tempo de retenção deste composto.

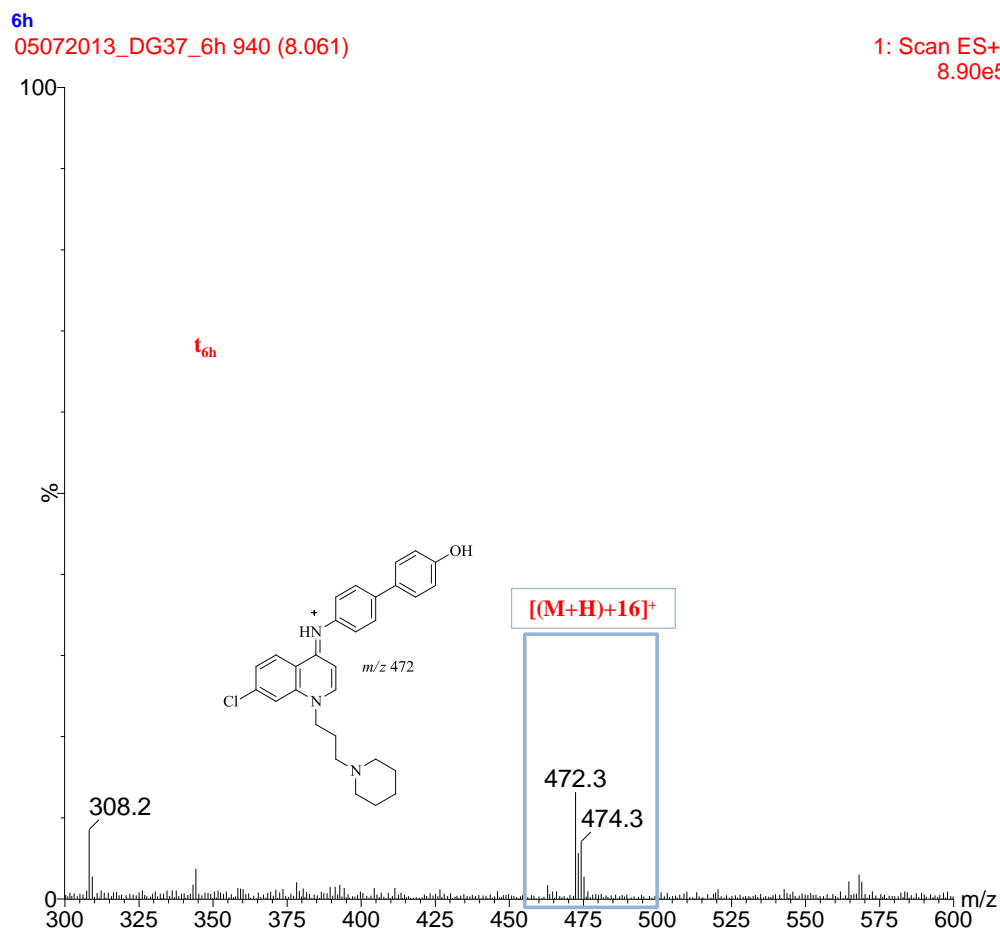


Figura 55 – Espectro de massa da molécula protonada de  $m/z$  472, possível metabolito hidroxilado, na mistura reacional  $t_{6h}$

No decorrer do trabalho, não se procedeu a fragmentação deste metabolito hidroxilado, com vista a estabelecer a sua identidade com base no seu padrão de fragmentação.

Foram adicionalmente pesquisados, por SIM os iões indicados na figura 56 e que não foram detetados nas condições de análise usadas.

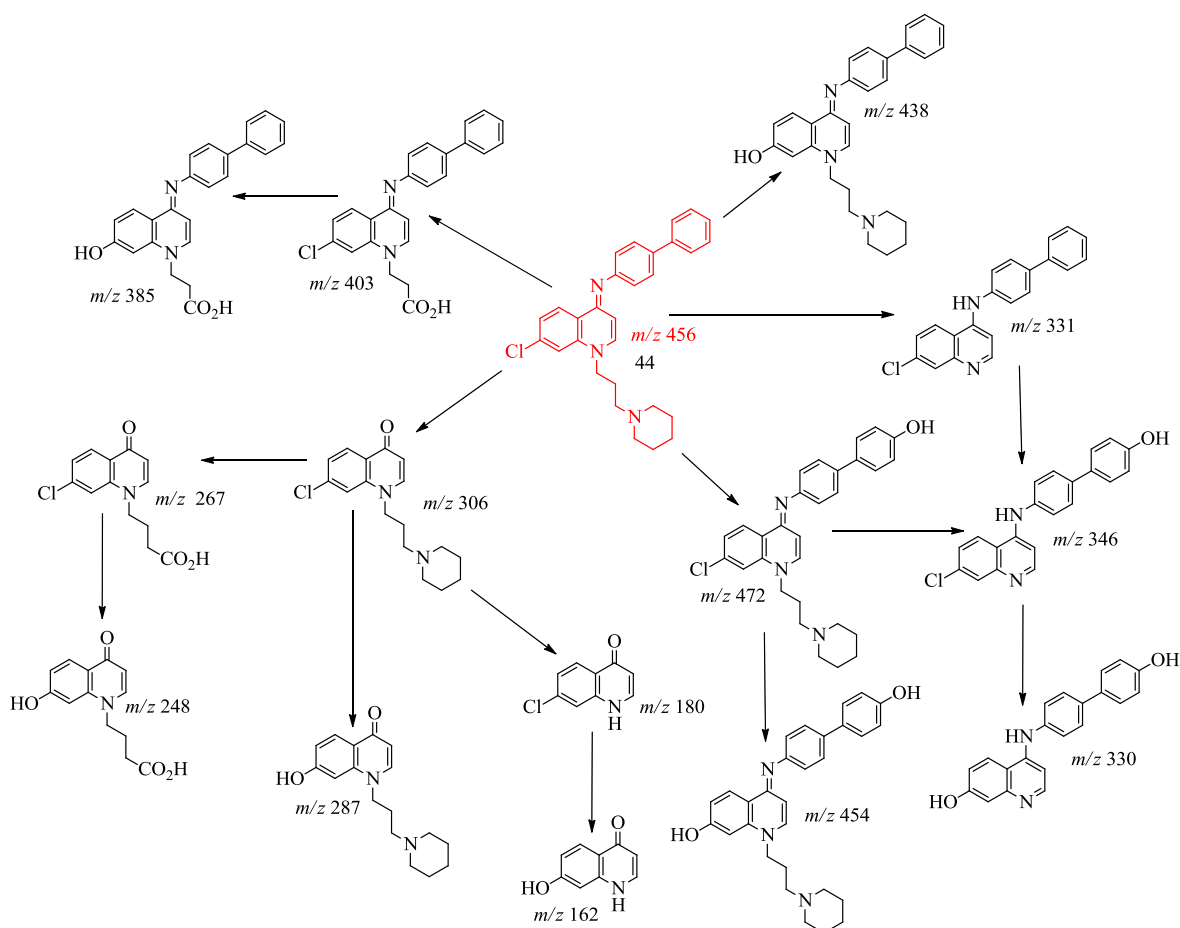


Figura 56 – Metabolitos suscetíveis de se formarem a partir da molécula protonada de **44**  
(adaptada da ref.[132])

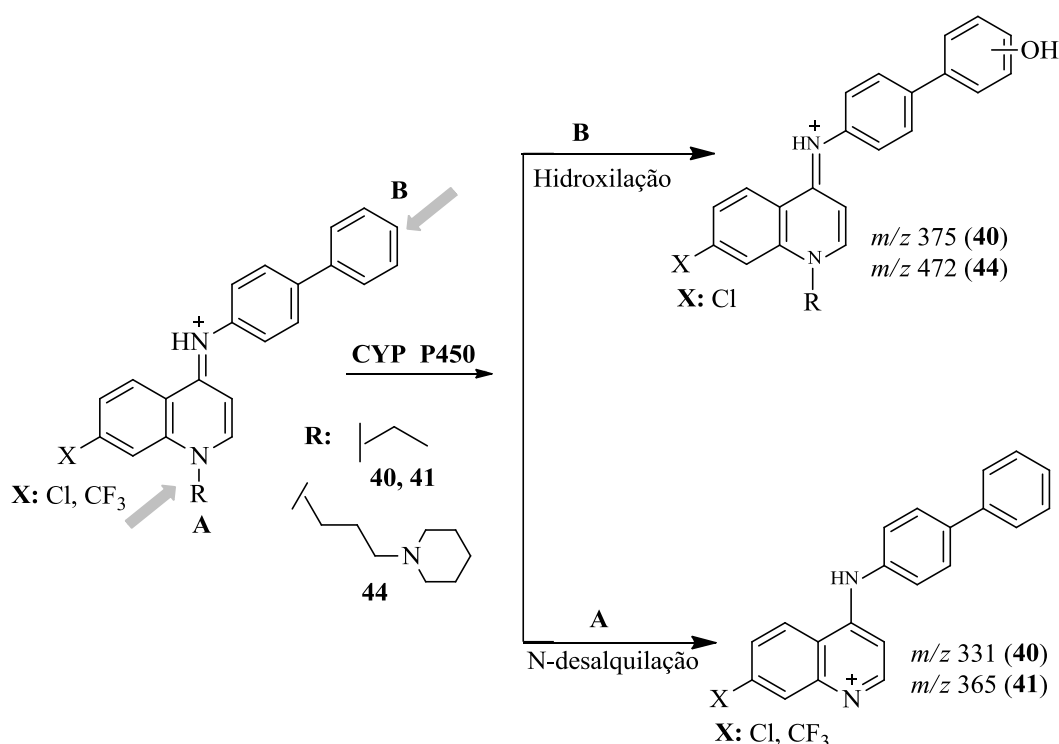
Os compostos **40** e **41** ( $R=C_2H_5$ ;  $X=Cl$  **40** e  $CF_3$  **41**) diferem um do outro pela presença do substituinte halogenado. Quando incubados em microssomas de fígado de rato, apresentaram valores de semi-vida de 4h (tabela 5). O composto **44** cujo  $R=N$ -alquilamina e  $X=Cl$ , apresentou uma percentagem de metabolização correspondente a 62,5% ao fim de 6h de incubação, menor tempo comparativamente ao obtido pelos compostos da mesma série **42-51**, que apresentam  $R=N$ -alquilamina (tabela 6).

As experiências efetuadas por MRM, permitiram detetar e identificar nas soluções  $t_{24h}$  o metabolito derivado da 4-quinolimina  $m/z$  331 no composto **40** e  $m/z$  365 no **41** formados como resultado da  $N$ -desalquilação. A formação do metabolito  $m/z$  331 não foi detetada no composto **44**.

A pesquisa pelo modo de varrimento de massas (MS scan), por comparação dos cromatogramas do ião extraído nas misturas reacionais  $t_{0h}$ ,  $t_{6h}$  e  $t_{24h}$  possibilitou a deteção de compostos hidroxilados  $[(M+H)+16]^+$  na mistura reacional  $t_{24h}$  do composto **40** ( $m/z$  375) e na alíquota  $t_{6h}$  de **44** ( $m/z$  472). A identidade do composto hidroxilado

$[(M+H)+16]^+$   $m/z$  375 (**40**), foi confirmada por comparação dos padrões de fragmentação de ambos os compostos. Os resultados obtidos permitiram concluir tratar-se de um metabolito hidroxilado de **40**, uma vez que os fragmentos de  $[(M+H)+16]^+$  correlacionam-se com os do composto **40**. Não se procedeu a identificação do metabolito  $m/z$  472 no composto **44**, mas o tempo de retenção deste metabolito que é menor em relação ao do composto precursor justifica o aumento da polaridade proporcionado pela presença do grupo OH.

A formação dos metabolitos detetados nos compostos **40**, **41** e **44** decorre de acordo com as vias de metabolização sugeridas no esquema 14.



Esquema 14 – Via de metabolização de **40**, **41** e **44**, conducente à formação dos metabolitos A:  $m/z$  331 e 365 (**40** e **41**) e B:  $m/z$  375 e 472 (**40** e **44**)

O trabalho desenvolvido permitiu detetar os principais metabolitos gerados num sistema microssomal contendo as enzimas do citocromo P450.

# **CAPÍTULO III**

---

## **Derivados Endoperóxidos Híbridos da PQ e ART**





### 3 – Derivados Endoperóxidos Híbridos da PQ e ART

#### 3.1 - Identificação e Caraterização Estrutural

Tal como, nos derivados da quinolon-4(1*H*)-imina a MS/ESI com analisador do tipo triplo quadrupolo (QQQ) foi também usada no estudo dos derivados endoperóxidos híbridos da primaquina e artemisinina PQ-ART. Estes compostos, também designados por derivados tetraoxanos, são estruturalmente constituídos por farmacóforos tetraoxanos e 8-aminoquinolinas, ligados através de um grupo amida de modo a formarem uma única entidade química, que oferece a possibilidade de exercerem a sua atividade não só contra as fases hepática e sanguínea, mas também como bloqueadoras da transmissão do parasita da malária ao mosquito vetor (figura 57).

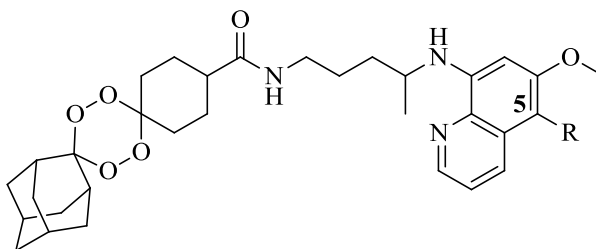


Figura 57 - Estrutura geral dos derivados tetraoxanos

Os compostos, na figura 58, também foram sintetizados no grupo Medicinal Chemistry do iMed.U LISboa e são ao longo do presente estudo identificados como **52**, **53**, **54** e **55**. [68, 160] Diferem estruturalmente entre si pela ausência da cadeia endoperoxídica (**52**) ou pelo substituinte R (**53**, **54** e **55**) na posição 5 (figura 57) do anel quinolínico introduzido com o objetivo de bloquear a hidroxilação da PQ, nessa posição e aumentar a sua estabilidade.

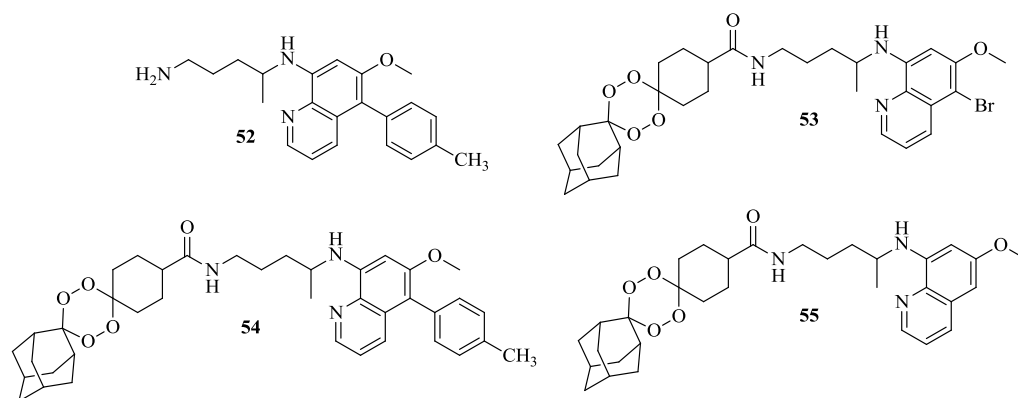


Figura 58 – Compostos **52**, **53**, **54** e **55** selecionados para o estudo

Os compostos na figura 58 foram selecionados para o presente estudo, com o objetivo de avaliar se a estabilidade dos mesmos, na fonte de ionização e no analisador é influenciada pela: *i*) presença do substituinte na posição 5 do anel quinolínico *ii*) natureza desses substituintes e *iii*) introdução da cadeia endoperoxídica na estrutura dos compostos.

As soluções dos analitos em ACN foram infundidas no espectrômetro de massa operando em modo positivo. Os espectros de massa, obtidos possibilitaram a confirmação das massas respectivas às moléculas protonadas  $[M+H]^+$  (ver anexo II.1). Todas as experiências foram conduzidas após otimização do potencial do capilar (CP – *Capilar Potential*), e do potencial do cone (SP – *Source Potential*). As condições otimizadas foram empregues para o estudo do padrão de fragmentação utilizando valores variáveis de energias de colisão de modo a prever a formação de fragmentos e estabelecer o mecanismo de fragmentação. Os procedimentos detalhados para esta avaliação estão descritos na Parte Experimental 5.2.1.

### 3.1.1 - Resultados e Discussão

#### 3.1.1.1 – Otimização do Potencial do Capilar (CP)

A otimização do CP, cujo diagrama é representada na figura 59, foi efetuada de forma análoga à descrita para os ensaios dos derivados quinolínicos (5.1.1).

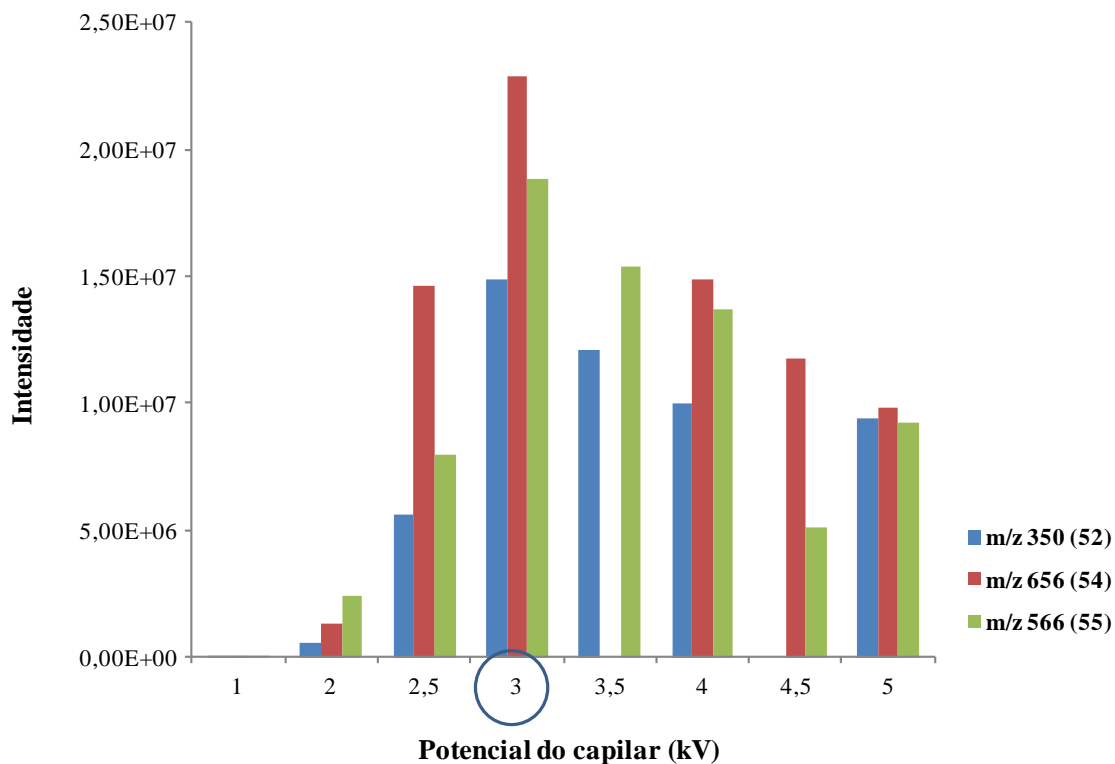


Figura 59 - Efeito da variação da voltagem do capilar no sinal instrumental obtido para as moléculas protonadas dos derivados tetraoxanos **52**, **53** e **54**

O valor do potencial de cone estabelecido para todos os derivados tetraoxanos foi de 3,0kV.

### 3.1.1.2 – Otimização do Potencial do Cone (SP)

O valor de SP estabelecido para todos os compostos foi de 30V, conforme mostrado na figura 60, que exemplifica os dados obtidos para o composto **52** (ver anexo II.2 para os compostos **53-55**).

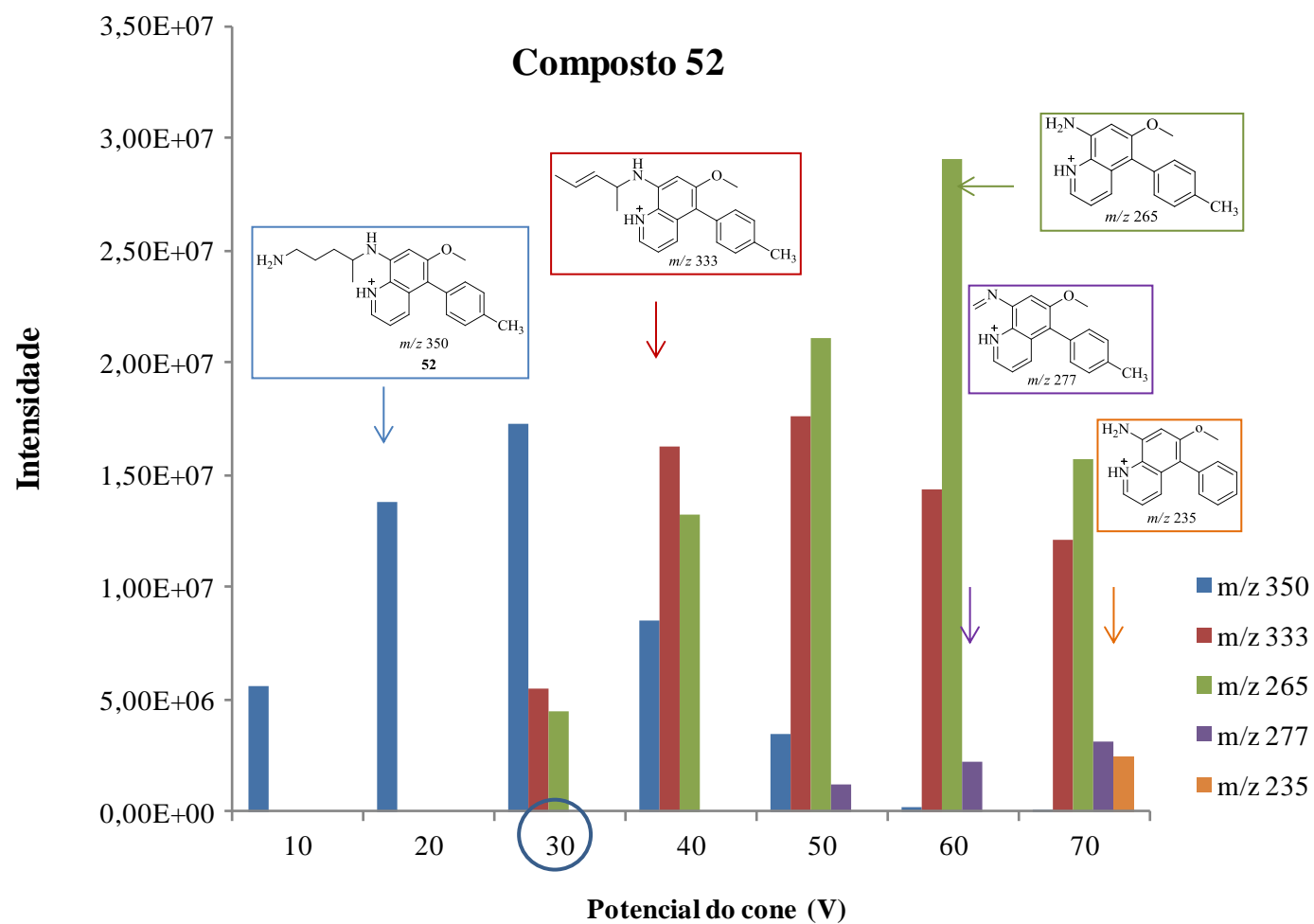
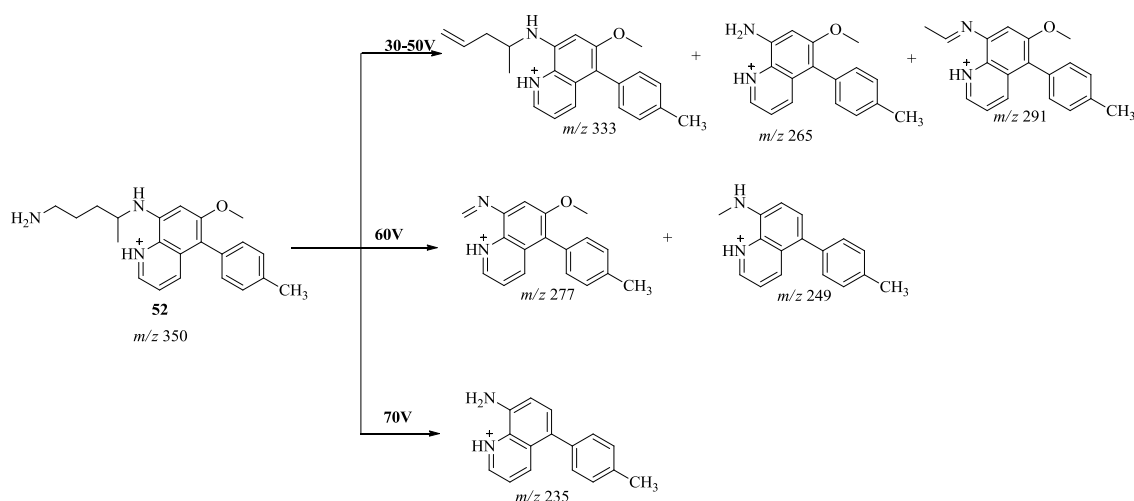


Figura 60 - Variação da intensidade de sinal dos iões detetados, correspondentes à molécula protonada do composto **52** em função da voltagem de cone aplicada

## 3.1.1.3 - Padrão de Fragmentação na Fonte de Ionização

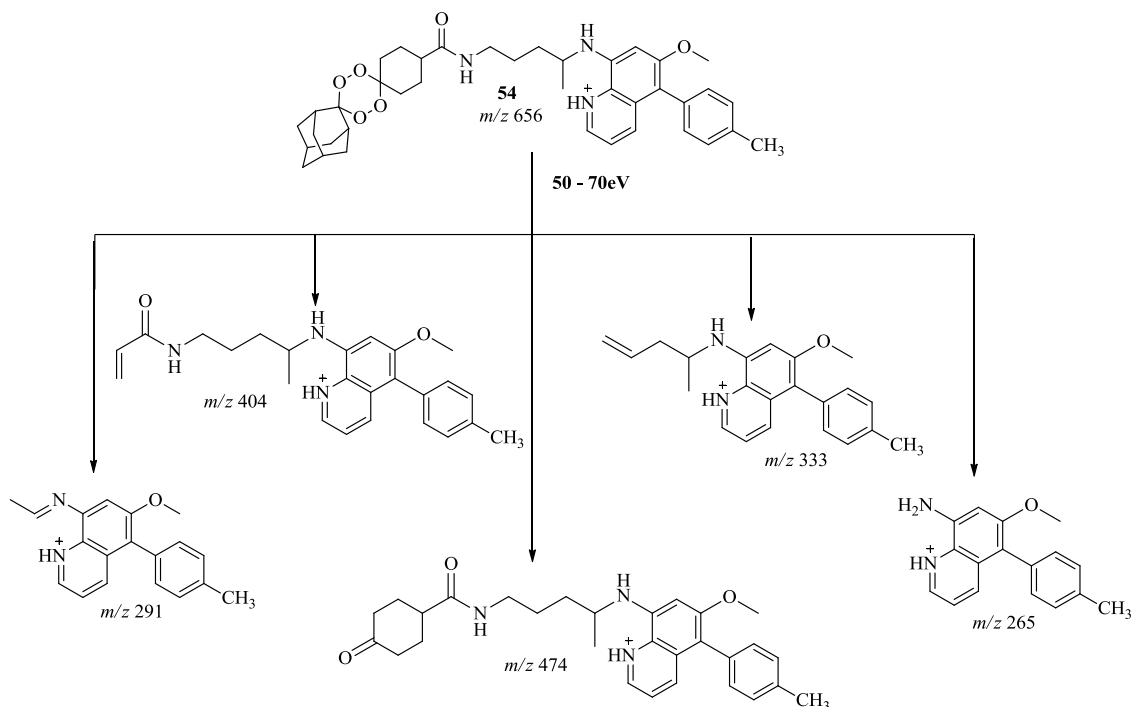
Na fonte de ionização, a estabilidade do composto **52**, que não possui a cadeia endoperoxídica, caracteriza-se pela presença da molécula protonada  $[M+H]^+$   $m/z$  350, a valores do potencial do cone  $< 30V$ . A fragmentação tem início a partir dos 30V com a formação dos iões produtos  $m/z$  333, 291 e  $m/z$  265, resultantes da perda de 17, 59 e 85 Da (ver esquema 15). Entre 50 e 60V não só se observa o desaparecimento da molécula protonada de **52**, como também tem início a redução da intensidade do fragmento  $m/z$  333 para favorecer o aumento da intensidade de  $m/z$  265 e a formação dos iões produto  $m/z$  277 e 249 resultantes respetivamente da perda de 73 e 101 Da. A valores de potencial de 70V, ocorre a redução dos iões produto formados para originar um ião produto  $m/z$  235 que corresponde á perda de 30 Da a partir de  $m/z$  265.



Esquema 15 – Iões produto da molécula protonada de **52**, formados na fonte entre 30 e 70V

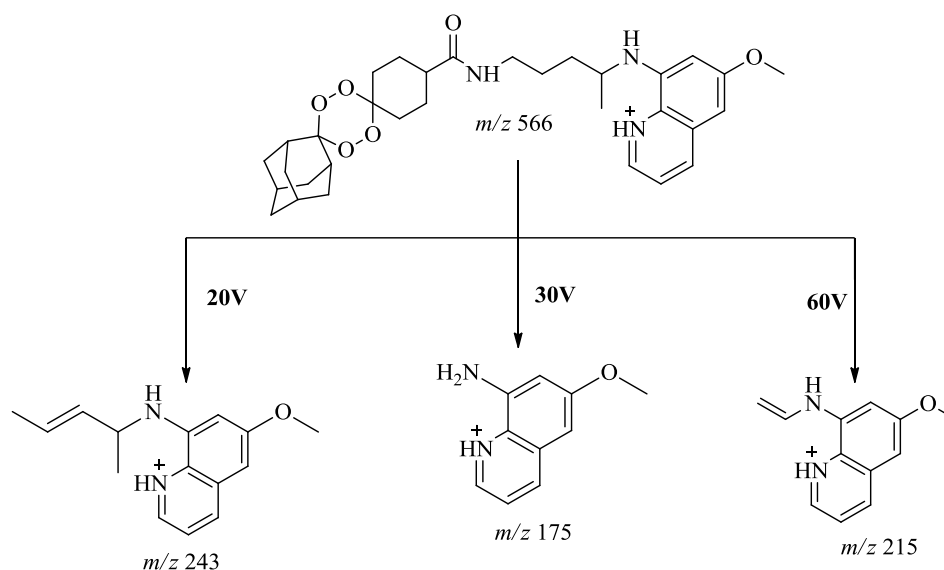
No composto **54** ( $m/z$  656), que difere do **52** por possuir a cadeia endoperoxídica, a fragmentação tem início a partir de valores do potencial de cone  $\geq 50V$ , com a formação dos iões produto  $m/z$  474, 404, 333 e 265, conforme mostrado no esquema 16. Os fragmentos  $m/z$  474, 404 correspondem respetivamente à perda de 182 e 252 Da resultantes da fragmentação da porção correspondente ao farmacóforo tetraoxano. A *N*-desalquilação da cadeia lateral do farmacóforo PQ ocorre com a formação de  $m/z$  333 e 265. A 60V forma-se o ião produto  $m/z$  291. A molécula protonada de **54** apresenta aos 70V uma abundância relativa de cerca de 8%. Neste composto, entre os 60 e 70V, ao contrário do observado na molécula protonada de **52**, não se regista a formação dos

fragmentos  $m/z$  277, 249 e 235, também resultantes da *N*-desalquilação.



Esquema 16 - Iões produto da molécula protonada de **54** formados na fonte entre 50 e 70V

No composto **55**  $m/z$  566, que em relação ao **54** não apresenta substituintes na posição 5 do anel quinolínico (figura 57) o primeiro fragmento detetado a valores de potencial do cone de 20V corresponde a  $m/z$  243 que resulta da perda de 340 Da correspondentes à fragmentação do farmacóforo tetraoxano e do grupo amida (ver esquema 17)



Esquema 17 - Iões produto da molécula protonada de **55** formados na fonte entre 20 e 70V

A *N*-desalquilação de  $m/z$  243 ocorre aos 30V com a formação de  $m/z$  175, cuja intensidade aumenta até aos 60V. A partir dos 50V as intensidades de  $m/z$  566 (**55**) e do íão produto  $m/z$  243 reduzem sendo o seu desaparecimento observado aos 60V. Acima deste valor a intensidade de todos os iões produto até então formados diminui e regista-se o aparecimento do íão produto  $m/z$  215.

#### 3.1.1.4 - Padrão de Fragmentação na Câmara de Colisão do QQQ

Os espectros de MS/MS das moléculas protonadas dos compostos **53** ( $m/z$  644), **54** ( $m/z$  656) e **55** ( $m/z$  566), contrariamente ao que acontece na fonte de ionização, apresentam um padrão de fragmentação comum, que se caracteriza, pela estabilidade das respetivas moléculas protonadas  $[M+H]^+$  até valores de energias de colisão  $<20\text{eV}$ .

Entre 25 e 30eV, conforme apresentado na figura 61 e no esquema 18, observa-se a formação simultânea de todos os iões produto característicos e comuns aos derivados híbridos da PQ-ART (**53**, **54**, **55**), nomeadamente: i) iões  $m/z$  462 (**53**), 474 (**54**) e 384 (**55**), resultantes da perda de 182 Da, correspondentes à cisão da cadeia endoperoxídica; ii) iões  $m/z$  392 (**53**), 404 (**54**) e 314 (**55**) correspondentes à quebra do anel da ciclohexanona; iii) iões  $m/z$  321 (**53**), 333 (**54**) e 243 (**55**) que resultam da cisão do grupo amida; iv) iões amínios  $m/z$  293 e 253 (**53**), 305 e 265 (**54**) e 215 e 175 (**55**), que resultam da *N*-desalquilação do composto e v) iões  $m/z$  86 e 69 comuns à todos os compostos e correspondentes à cadeia aminoalquílica protonada.

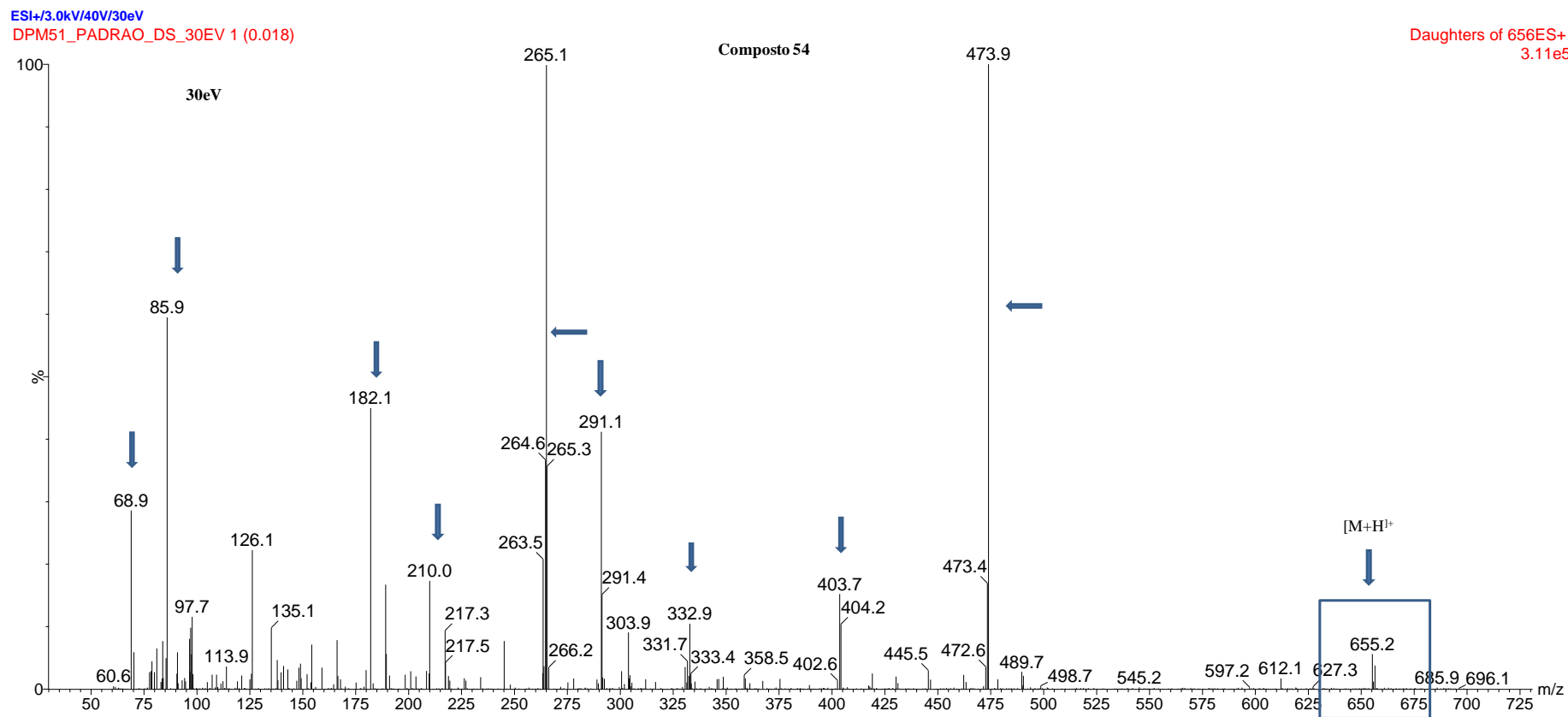
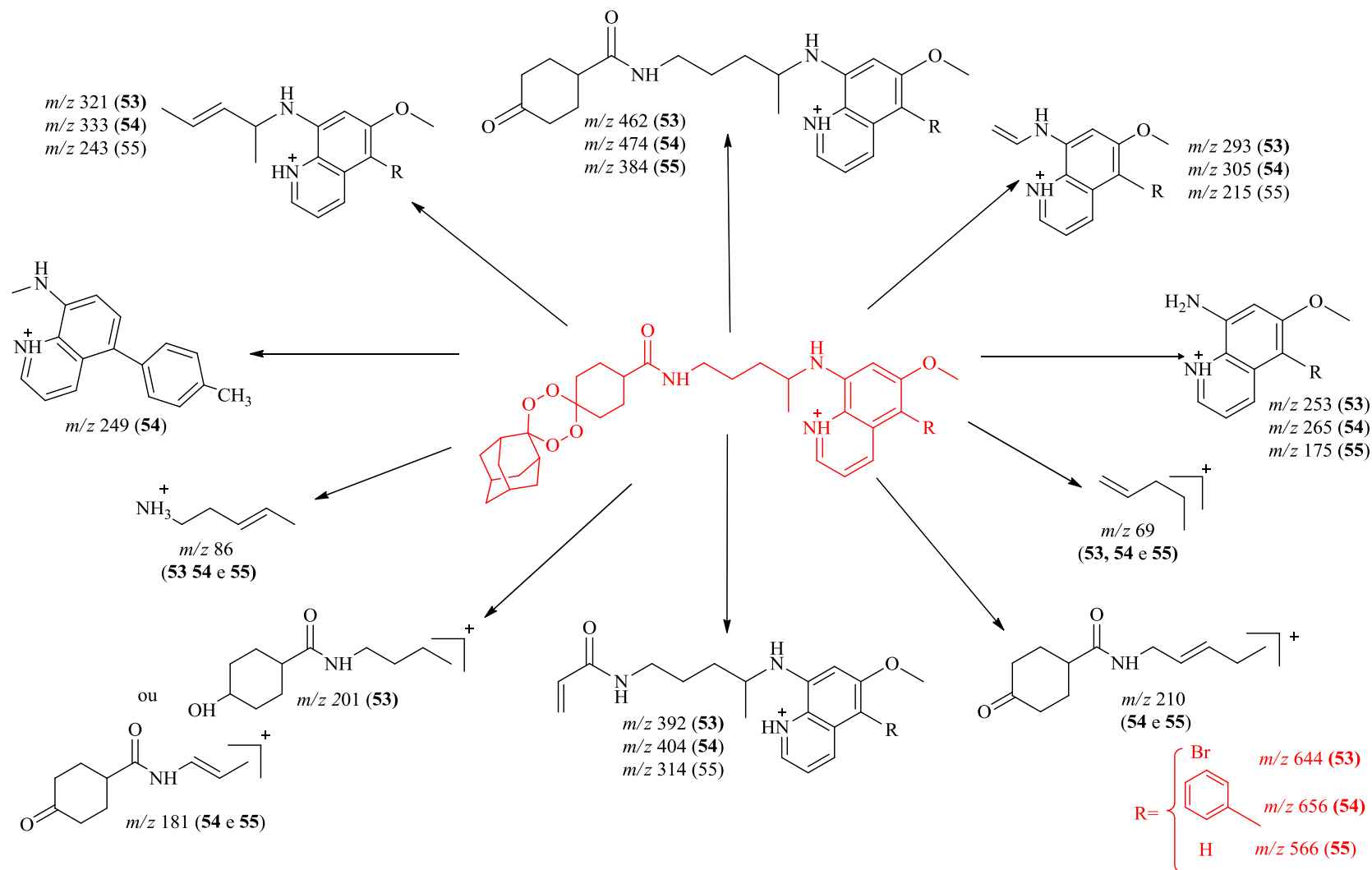


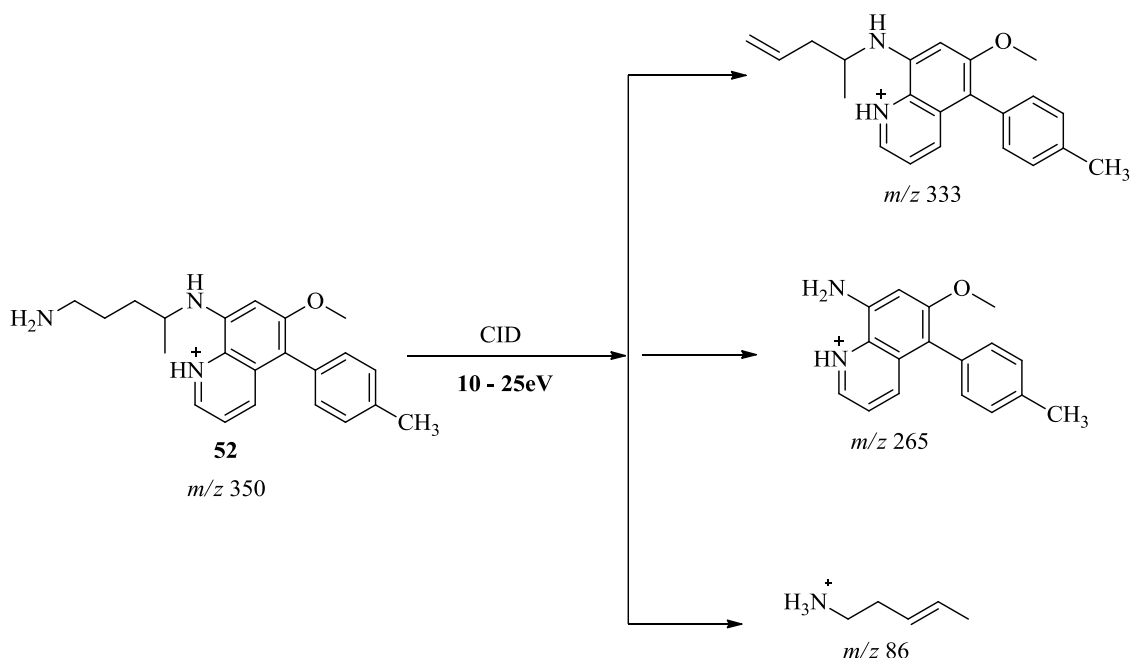
Figura 61 – Espectro MS/MS característico para as moléculas protonadas dos compostos **53**, **54** e **55** quando aplicada a energia de colisão de 30eV.




 Esquema 18 - Mecanismo de fragmentação das moléculas protonadas de **53-55** quando aplicada a energia de colisão entre 25 e 30 eV.

Em todos os compostos, o aumento da energia de colisão acima dos 25eV contribui, para a redução da intensidade da molécula protonada, para valores inferiores a 15% de abundância relativa. O seu desaparecimento ocorre a 35eV. Entre 35 e 40eV ocorre a redução da intensidade dos iões  $m/z$  462 (**53**), 474 (**54**) e 384 (**55**), para favorecer o aumento da intensidade dos fragmentos  $m/z$  210 (**54** e **55**), 279 (**53**),  $m/z$  291 e 249 (**54**), e 69 (**54**, **55** e **56**). À energias de colisão de 40eV, não se observam os iões  $m/z$  462 (**53**), 474 (**54**) e 384 (**55**), cuja abundância relativa é inferior a 10%. Os iões  $m/z$  86 e 69, comuns a todos os compostos, entre os 30 e 40eV aumentam de intensidade e mantêm a mesma proporção por volta dos 40eV. Com base nesta constatação pode-se presumir que o aumento da intensidade destes dois sinais é favorecido pela degradação da cadeia alquílica dos iões  $m/z$  462 (**53**), 474 (**54**) e 265 (**55**). No entanto, o aumento da intensidade do sinal  $m/z$  69, acima dos 40eV é presumivelmente favorecido pela fragmentação do ião  $m/z$  86, por perda de 17 Da, correspondentes à saída de  $\bullet\text{NH}_3$ .

A formação de fragmentos no composto **52**, que comparativamente ao composto **54** não apresenta a cadeia endoperoxídica, ocorre de forma gradual, com a formação aos 10eV de iões:  $m/z$  333 resultante da perda de 17 Da,  $m/z$  265 resultante da *N*-desalquilação e  $m/z$  86 (esquema 19).



Esquema 19 – Mecanismo de fragmentação da molécula protonada de **52** quando aplicada a energia de colisão entre os 10 e os 25eV

Entre os 30 e 45eV são formados fragmentos adicionais  $m/z$  277, 249, 235 221,

originados a partir do íon  $m/z$  333, (núcleo aminoquinolínico) e resultantes da fragmentação da cadeia aminoalquílica, (figura 62). Tal como ocorrido na fonte de ionização, os íões produto  $m/z$  277, 235 e 221 não foram observados no composto **54**, o que leva a presumir que a presença da cadeia endoperoxídica contribui para o aumento da estabilidade da cadeia alifática do farmacóforo das 8-aminoquinolinas, quando sujeita a valores crescentes de energias de colisão.

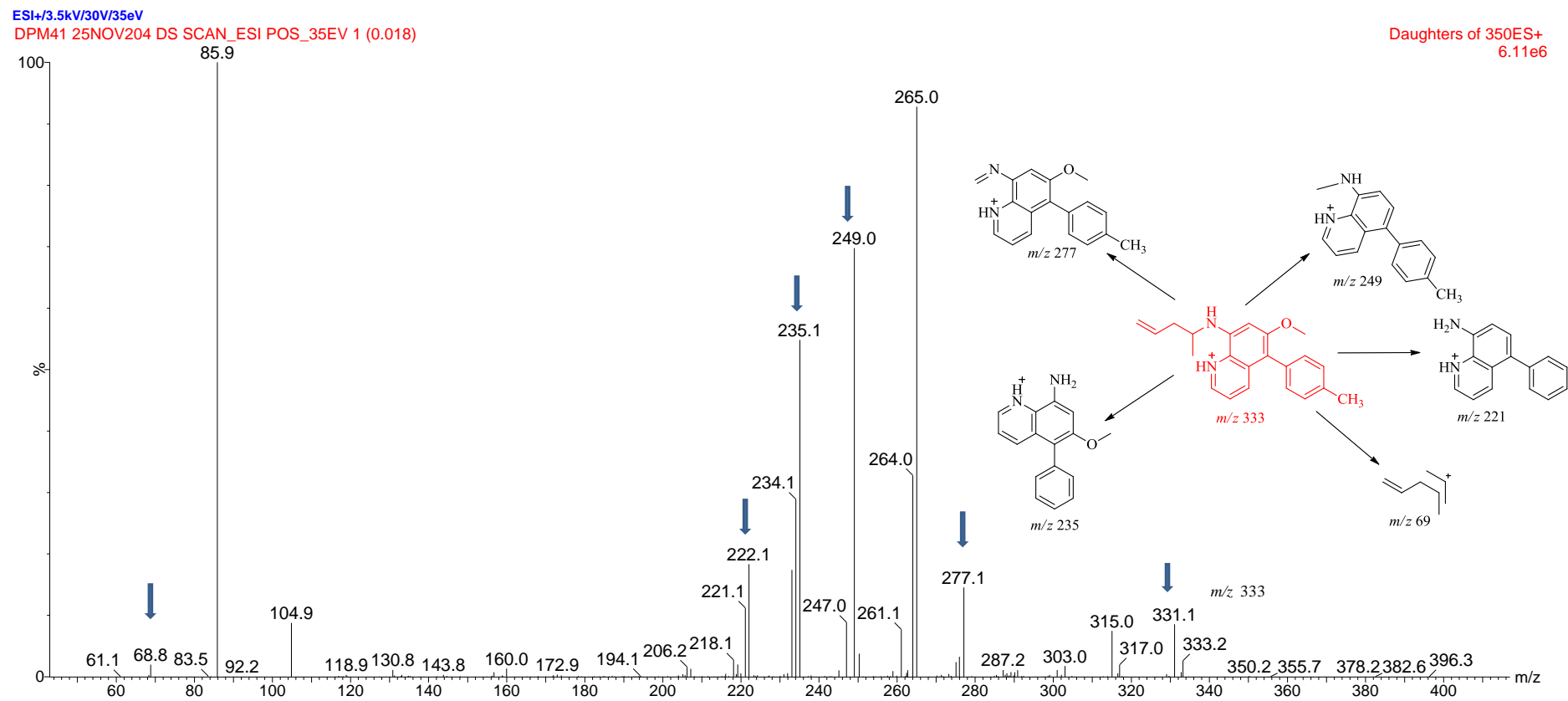


Figura 62 – Espectro MS/MS e mecanismo de fragmentação d a molécula protonada de **52** quando aplicada a energia de colisão entre 30 e 45eV

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que as diferenças estruturais, determinadas pela presença de substituintes na posição 5 (figura 58) e a natureza dos substituintes incorporados, de um modo geral, não influenciam o comportamento, dos compostos quando submetidos a condições variáveis de energia de colisão.

O composto **52**, que difere dos restantes por não incorporar a cadeia endoperoxídica foi estudado com o objetivo de aferir o efeito dessa cadeia, na estabilidade. Os resultados obtidos revelam que a fragmentação de **52**, quando comparada com a do composto **54**, inicia a valores de energia de colisão mais baixos 10eV e de forma gradual. A valores de 30eV origina maior número de fragmentos, como resultado da *N*-desalquilação. Esta constatação permite concluir que presença da cadeia endoperoxídica no composto **54** pode contribui de certa forma para o aumento da estabilidade da cadeia lateral do farmacóforo da PQ.

Os mecanismos de fragmentação aqui propostos, também reforçam a ideia da ocorrência da ativação sequencial em analisadores do tipo QQQ.

### 3.2 – Avaliação da Estabilidade Metabólica

Os procedimentos para a avaliação da atividade enzimática dos microsomas, declarada pelo fabricante, por métodos espectrofotométricos UV/VIS e para a avaliação da estabilidade em tampão fosfato isotônico pH 7,4, foram os mesmos empregues para as quinolimas e que se encontram descritos na Parte Experimental (5.1.2.1.3). Para a determinação dos tempos de retenção e do eluente apropriado, com vista a avaliar, por HPLC, o decréscimo da área dos picos dos compostos em função do tempo, foi neste caso usado o equipamento LC-MS de acordo com as condições experimentais descritas em 5.2.2.1.

Para a correta identificação de cada um dos compostos foram utilizadas soluções dos mesmos, em ACN (5.2.2.2).

A avaliação da estabilidade metabólica foi efetuada em condições de pseudo-primeira ordem, com base na determinação das constantes de velocidade da reação  $k_{obs}$  e dos tempos de semi-vida  $t_{1/2}$ .

### 3.2.1 – Resultados e Discussão

#### 3.2.1.1 – Otimização das Condições Cromatográficas por HPLC

As condições cromatográficas para a análise dos compostos **52-55** foram estabelecidas no LC-MS de acordo com as condições descritas em 5.2.2. Os tempos de retenção obtidos encontram-se representados na tabela 7.

Tabela 7 – Tempos de retenção obtidos para os derivados tetraoxanos

Composto	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Tempo de retenção (min)
<b>52<sup>a</sup></b>		H	10,9
<b>53</b>	Br		5,5
<b>54</b>			7,3
<b>55<sup>b</sup></b>	H		5,76

Os valores de  $t_r$  representados na tabela acima foram usados para a identificação dos compostos no estudo da estabilidade metabólica.

#### 3.2.1.2 - Avaliação da Estabilidade em Tampão Fosfato

O valor das áreas cromatográficas dos compostos incubados em PBS (pH=7,4, 50 mM), nos diferentes tempos e sob as mesmas condições de ensaio manteve-se constante durante o período do ensaio o que revela a não ocorrência de fenômenos que pudessem contribuir para a metabolização dos compostos na ausência de sistemas de regeneração (anexo II.3).

### 3.2.1.3 - Avaliação da Estabilidade nos Microsomas de Fígado de Rato

Tal como descrito, para as quinolimas, a avaliação, em triplicado, da estabilidade dos tetraoxanos nos microsomas de fígado de ratos, por LC, baseou-se na observação da redução da concentração do substrato, ao longo do tempo (figura 63). Durante os ensaios não foi detetada a presença de picos novos, que pudessem ilustrar a formação de possíveis metabolitos do composto **54**, embora seja notória na figura 63 a diminuição da área do pico correspondente ao cromatograma do ião extraído  $m/z$  656. (ver anexo II.4, para os restantes compostos).

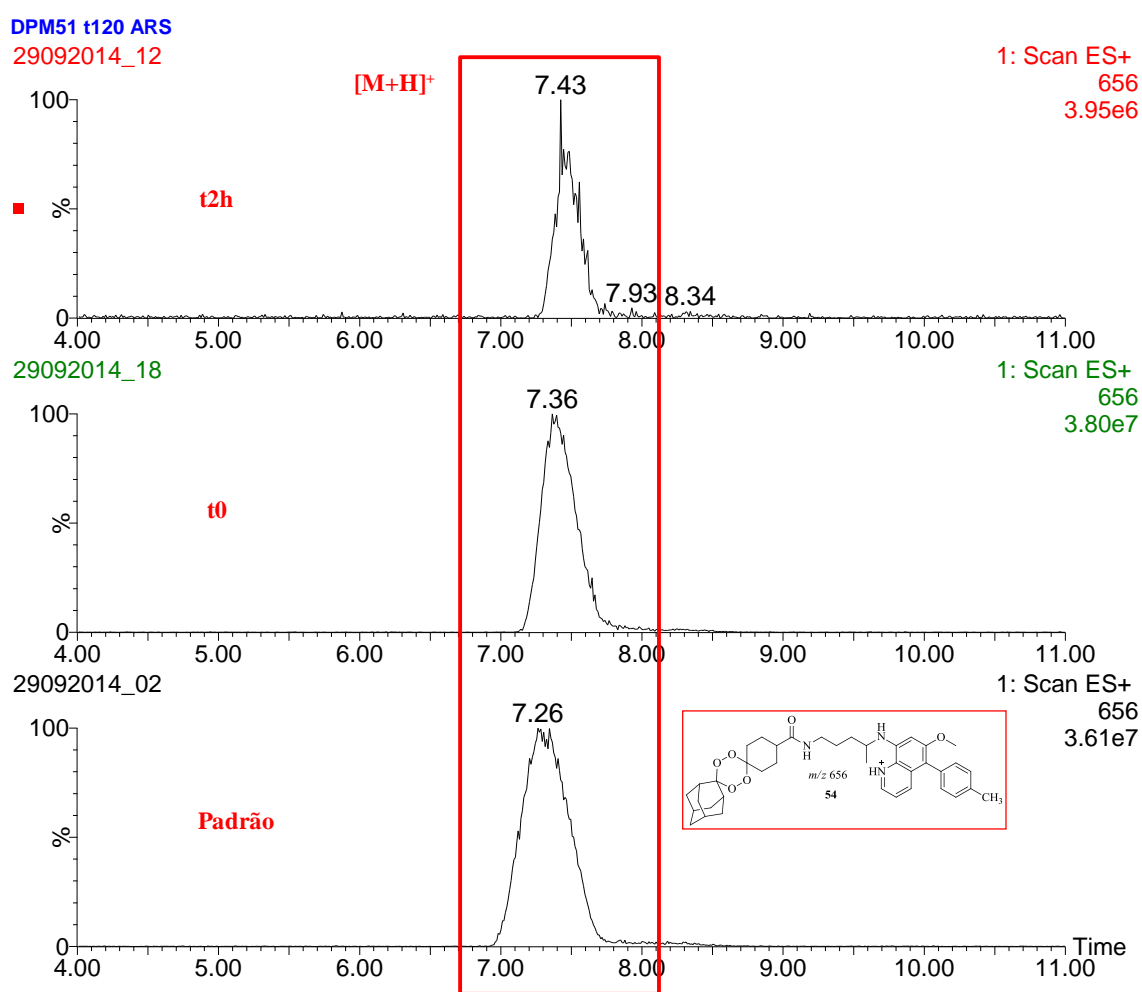


Figura 63 - Cromatogramas do ião extraído  $m/z$  656 da molécula protonada do composto **54**, em homogenato de fígado de rato, nas misturas reacionais  $t_{0h}$  e  $t_{2h}$

Os valores das constantes de velocidade de pseudo-primeira ordem ( $k_{obs}$ ) e os  $t_{1/2}$  obtidos após a realização dos ensaios são apresentados na tabela 8.

Tabela 8 – Valores de  $t_{1/2}$  dos derivados tetraoxanos

Composto	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	k <sub>obs</sub> (min <sup>-1</sup> )	t <sub>1/2</sub> (min)
52		H	0,0035	196,5
53	Br		0,051	13,5
54			0,0079	87,2
55	H		0,069	10,0

Os resultados na tabela 8 permitem concluir que, à exceção do composto **52** com um  $t_{1/2}$  de cerca de 200 min, os derivados tetraoxanos apresentam uma taxa de metabolização, em microsomas de fígado de ratos, bastante elevada.

A ausência de substituintes na posição de bloqueio da hidroxilação da PQ, posição 5 do anel quinolínico (composto **55**) e/ou a introdução de Br, na mesma posição (composto **53**) proporcionam valores de  $t_{1/2}$  muito baixos, que variam entre os 10 e 30 minutos. Este resultado permite concluir que a incorporação do Br na posição 5, não melhora a estabilidade metabólica dos derivados tetraoxanos.

Nos compostos **53-55**, com a cadeia endoperoxídica, a estabilidade pode ser melhorada com a introdução do substituinte fenilmetilo, como é o caso do **54**, que apresenta uma semi-vida de aproximadamente 90 min.

O tempo de semi-vida do composto **52** que difere do **54**, por não possuir a cadeia endoperoxídica, é duas vezes superior, o que nos leva a concluir que a introdução desta cadeia reduz significativamente a estabilidade metabólica do composto **54**.



### 3.3 – Detecção e Identificação de Metabolitos

#### 3.3.1 - Discussão dos Resultados

Os compostos **52-55** apresentados na figura 58, foram também submetidos a este estudo com o objetivo, como foi anteriormente referido, de avaliar o efeito, na metabolização dos compostos: *i*) da presença do substituinte na posição 5 do anel quinolínico *ii*) da natureza desses substituintes e o efeito *iii*) da introdução da cadeia endoperoxídica na estrutura dos compostos.

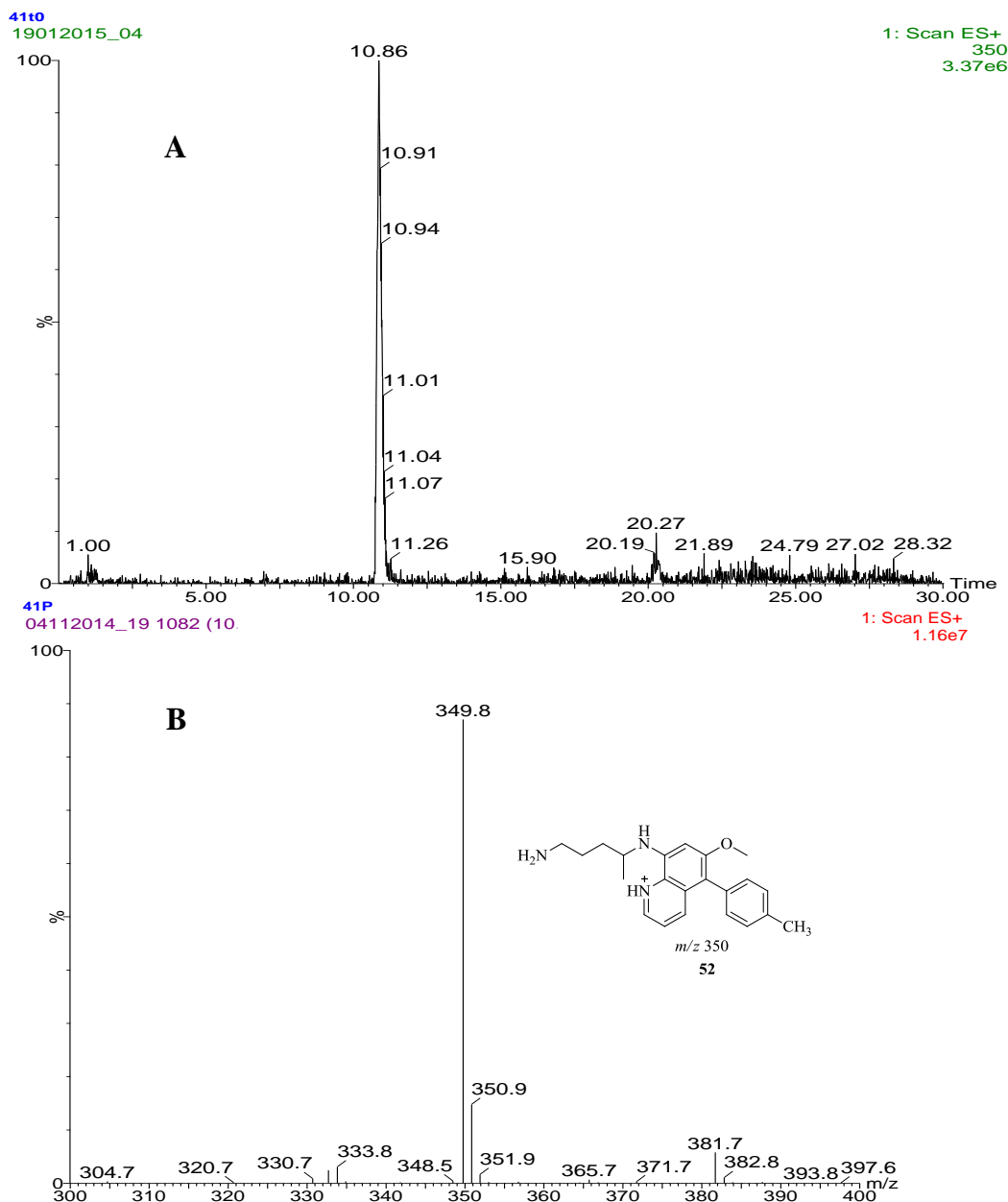
As soluções dos compostos, usadas para a pesquisa de metabolitos, foram as misturas de incubação em microssomas, nos tempos  $t_{0h}$ ,  $t_{1h}$  e  $t_{2h}$ , preparadas pelo procedimento descrito na Parte Experimental (5.2.2.2)

A pesquisa de metabolitos foi efetuada nas amostras em que foi, por LC-MS detetado o aparecimento de novos picos. A análise baseou-se na comparação dos cromatogramas obtidos por varrimento (MS Scan) e na avaliação do perfil de absorção dos compostos. Na ausência de picos novos que pudessem evidenciar a formação de metabolitos, a pesquisa foi com base na monitorização seletiva de iões (SIM - Single Ion Monitoring), que possibilitou a pesquisa de massas de acordo com as estruturas de possíveis metabolitos sugeridos pelo *software da Meta2D Print*.

A identidade dos metabolitos detetados foi confirmada por indução da fragmentação dos compostos e posterior comparação do padrão de fragmentação obtido com o do respetivo composto precursor.

##### 3.3.1.1 – Identificação Estrutural dos Metabolitos do Composto 52

O cromatograma, apresentado na figura 64A, corresponde à análise de uma solução preparada com o composto **52**. A identificação do composto foi efetuada com base no espetro de massa apresentado na figura 64B.



**Figura 64** – A) Cromatograma e B) Espectro de massa da molécula protonada do composto **52** com  $t_r=10,8$  min

O espectro de massa do composto **52** mostra a presença de  $m/z$  a 366 e 382, cujas massas podem corresponder respetivamente a presumíveis derivados mono e di-hidroxilados, isto é, a  $[(M+H)+16]^+$  e  $[(M+H)+32]^+$ . Os espectros MS/MS obtidos entre 5 e 30eV apresentam fragmentos que não se correlacionam com o composto (anexo II.5).

O cromatograma obtido ao comprimento de onda de 265nm, assim como o cromatograma do ião extraído  $m/z$  350 (figura 65), mostram que entre as alíquotas  $t_{1h}$  e  $t_{2h}$ , ocorre uma variação da intensidade do pico do composto, que corresponde a um

decréscimo da área de cerca de 20,0%.

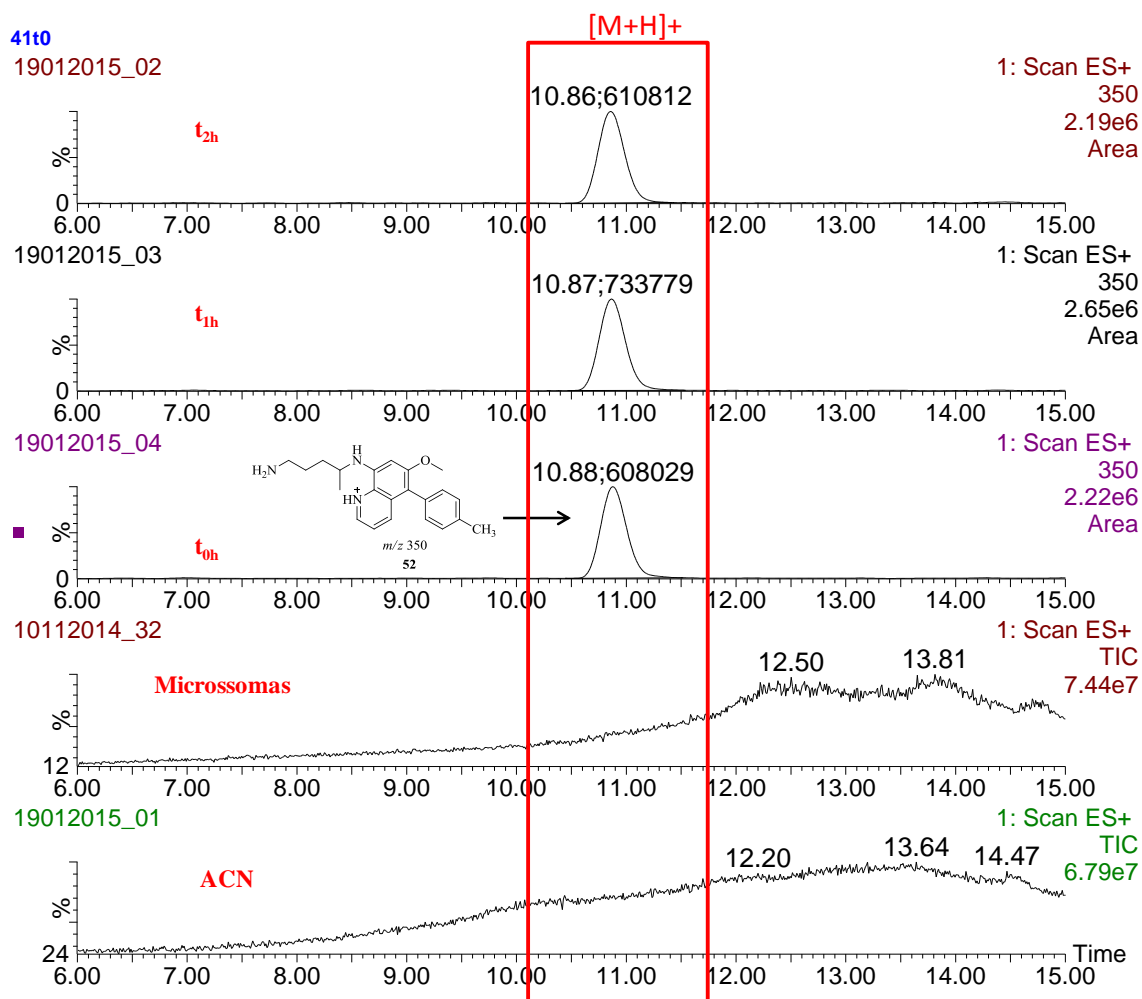


Figura 65 – Cromatogramas do ião extraído  $m/z$  350, nas misturas reacionais  $t_{0h}$ ,  $t_{1h}$  e  $t_{2h}$ , da molécula protonada do composto 52

A formação de metabolitos foi pesquisada por comparação dos cromatogramas, nos diferentes tempos de reação. Esta avaliação resultou na detecção de dois picos, nas alíquotas  $t_{1h}$  e  $t_{2h}$ , com o tempo de retenção de 6,1min e 16,47min, conforme ilustrado na figura 66.

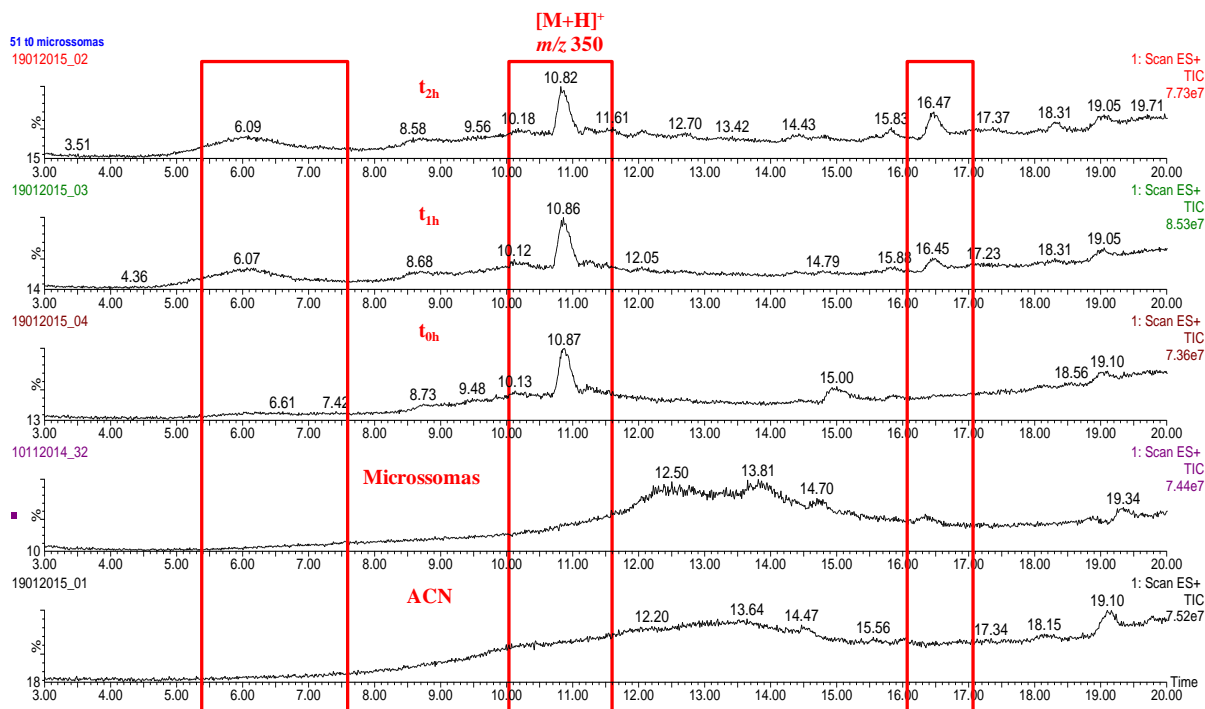
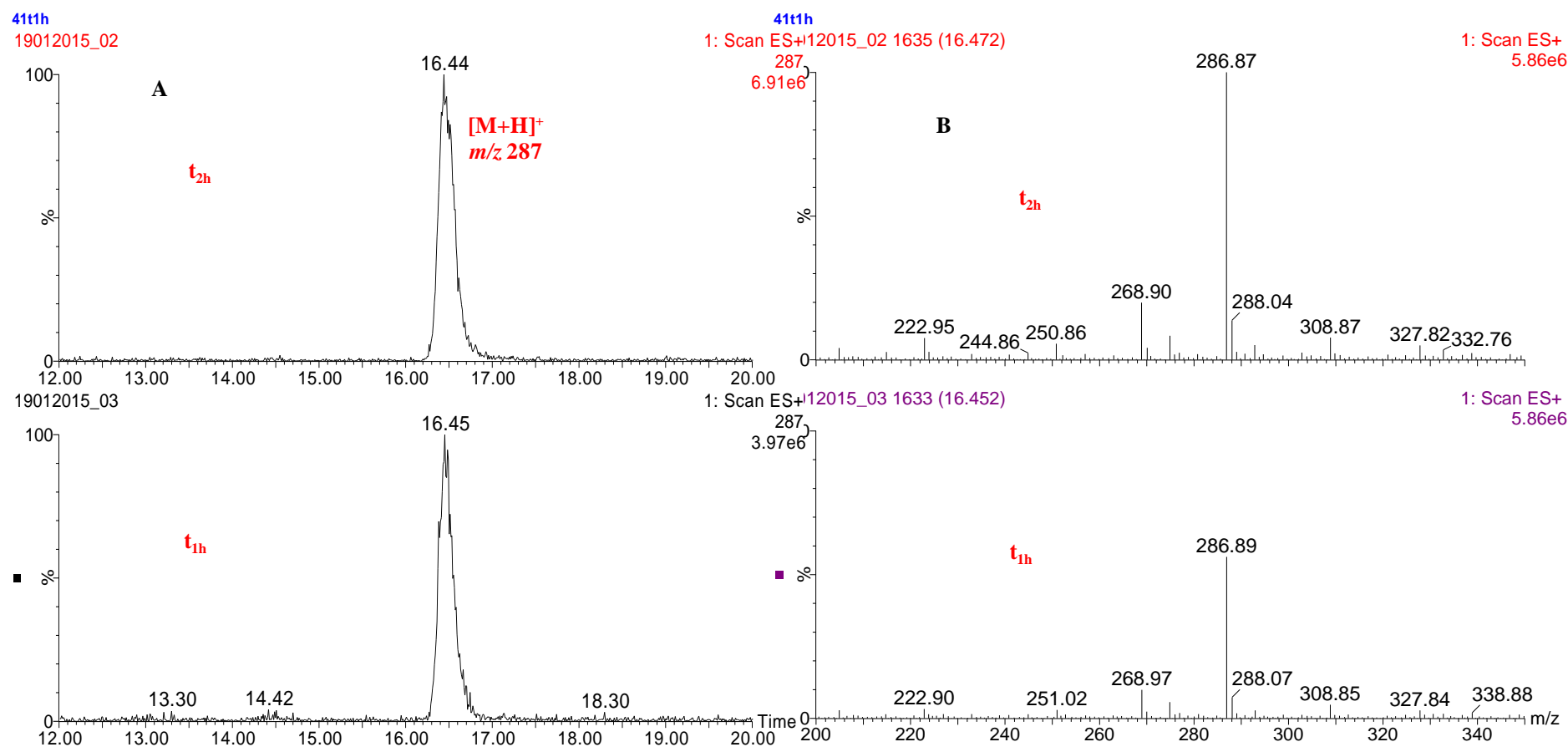


Figura 66 – Comparação dos cromatogramas da molécula protonada do composto **52** nas misturas reacionais  $t_{0h}$ ,  $t_{1h}$  e  $t_{2h}$

O espectro de massa do pico com o  $t_r=6,1$ min permitiu a detecção de  $m/z$  365 e 745, que após fragmentação originam iões produto que não se correlacionam com a estrutura do composto **52**. A intensidade do pico que elui aos  $t_r=16,47$ min aumenta ao longo do tempo em cerca de 89% de acordo com a figura 67A. O espectro de massa revela tratar-se de um composto  $m/z$  287.

Com o objetivo de se identificar este composto, procedeu-se à sua fragmentação entre os 10 e os 20eV. O padrão de fragmentação do composto apresentado na figura 68, não apresenta semelhanças com o padrão de **52** apresentado no esquema 19 e na figura 62.


 Figura 67 – A) Cromatogramas e B) Espectros de massa do ião extraído  $m/z$  287 nos  $t_{1h}$  e  $t_{2h}$

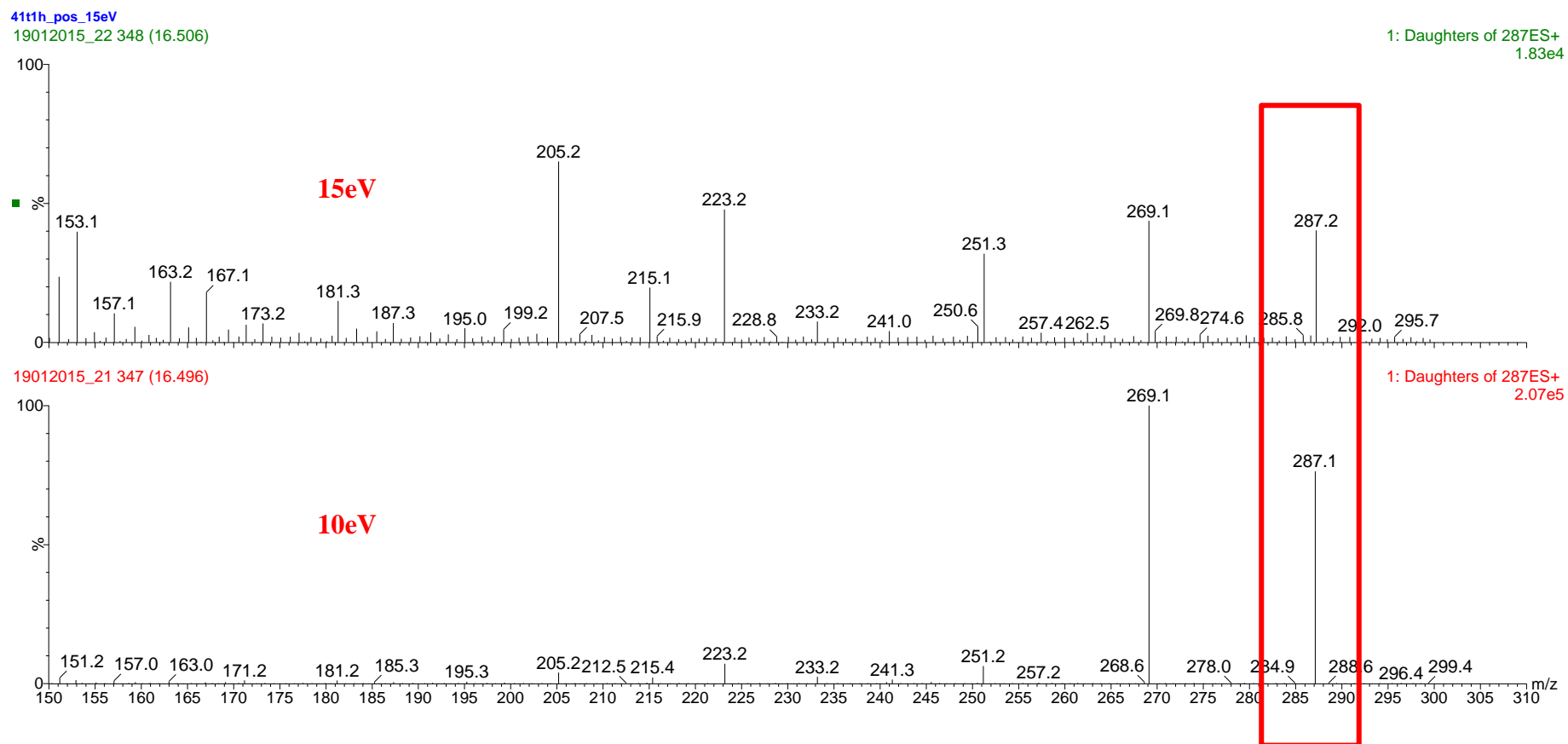


Figura 68 - Padrão de fragmentação de  $m/z$  287 ente os 10 e 15eV

A pesquisa de outros metabolitos eventualmente formados foi efetuada através da monitorização seletiva de iões (SIM), que incidiu sobre os metabolitos sugeridos pelo *software MetaPrint2D* (figura 69) e foi efetuada para os  $m/z$  265, 307, 333, 336, 349, 350, 351, 352, 353, 365, 366 e 368.

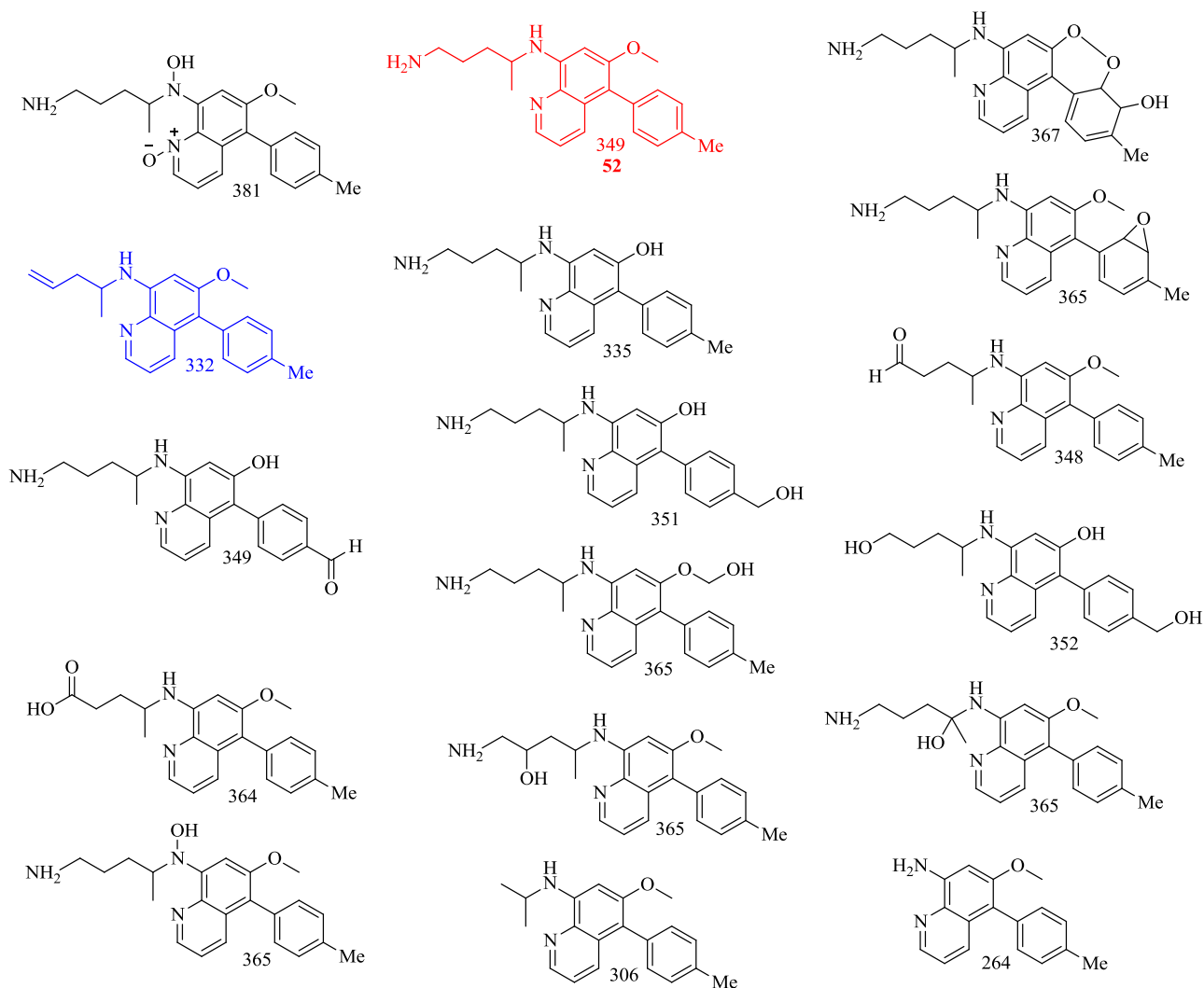


Figura 69 – Metabolitos previstos, para o composto **52**, de acordo com o *software MetaPrint2D*

Os resultados obtidos permitiram indicar a formação de um possível metabolito  $m/z$  333 (indicado a azul na figura 69), com uma abundância relativa de 18,9%. A abundância relativa deste composto na alíquota  $t_{0h}$  era < 5,0 %

A confirmação da identidade do metabolito  $m/z$  333 foi efetuada através da sua fragmentação a energias de colisão entre 15 e 30eV, conforme representado no esquema 20.

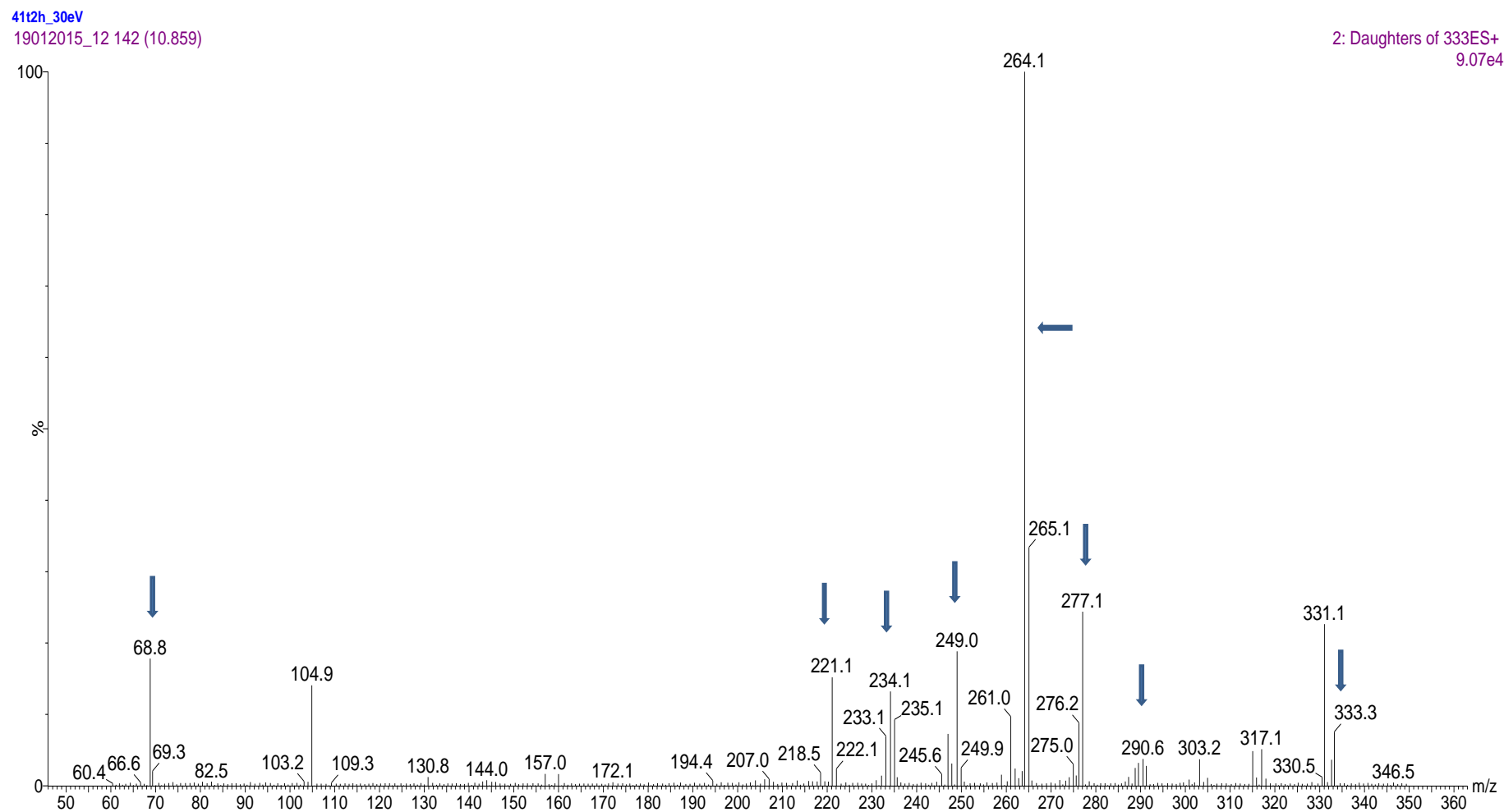
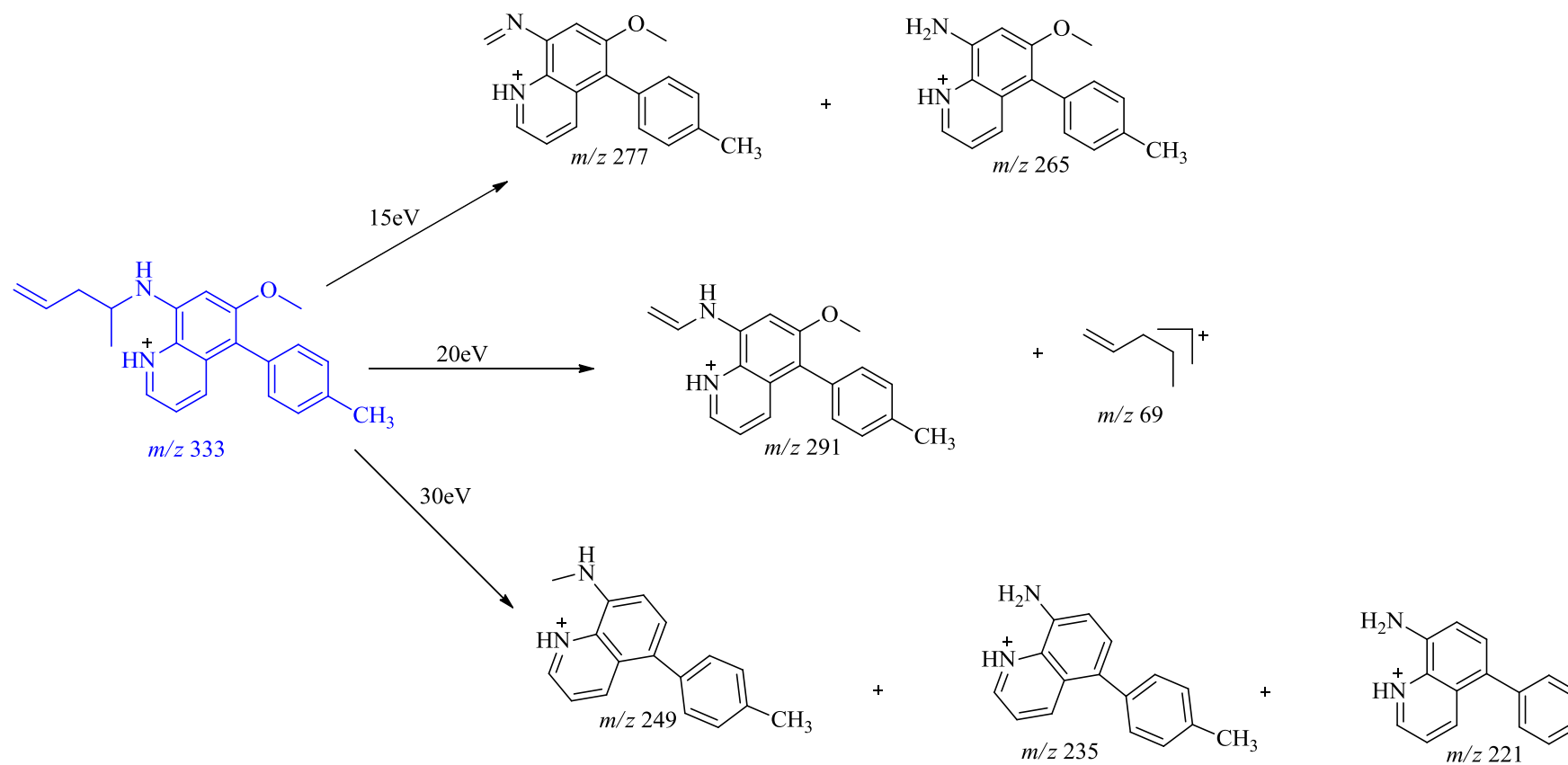


Figura 70 – Espectro MS/MS de  $m/z$  333, obtido por aplicação de energias de colisão entre 15 e 30eV

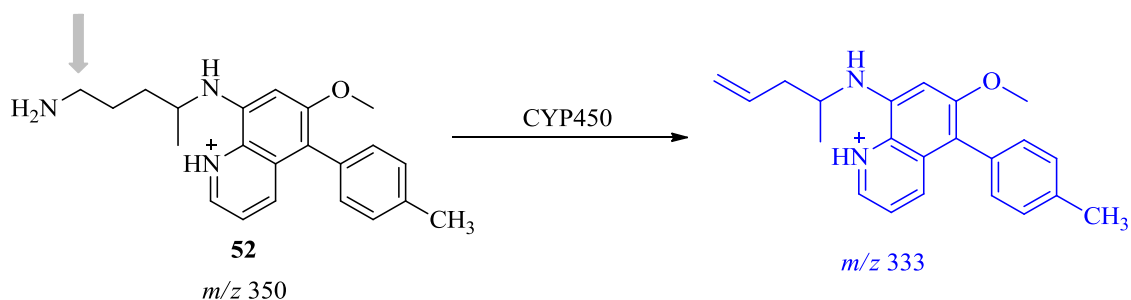




Esquema 20 - Mecanismo de fragmentação de  $m/z$  333 quando aplicada a energia de colisão entre os 15 e os 30eV

O espectro MS/MS da molécula protonada  $m/z$  333, representado na figura 70, assim como o padrão de fragmentação no esquema 20, mostram semelhanças com o padrão de fragmentação de **52** previamente estabelecido no esquema 19 e na figura 62.

A formação deste metabolito decorre de acordo com a via de metabolização proposta no esquema 21.



Esquema 21 – Via de metabolização da molécula protonada de **52**, conducente à formação do metabolito  $m/z$  333

Os resultados obtidos permitem concluir que o composto  $m/z$  333 é um metabolito de **52** formado após 2h de incubação do composto nos microsomas de fígado de rato. O metabolito  $m/z$  333 resulta da ação das enzimas do citocromo P450 num sistema microsomal que também contém *amidases*.

### 3.3.1.2. – Identificação Estrutural dos Metabolitos do Composto **53**

O cromatograma, apresentado na figura 71A, corresponde à análise de uma solução preparada com o composto **53**. A confirmação da identificação do composto foi efetuada com base no espectro de massa  $m/z$  644. O composto **53** possui na sua composição um átomo de Br, cuja razão de massas isotópicas características ( $^{79}\text{Br}:$  $^{81}\text{Br}=1:1$ ), é confirmada no espectro de massa apresentado na figura 71B

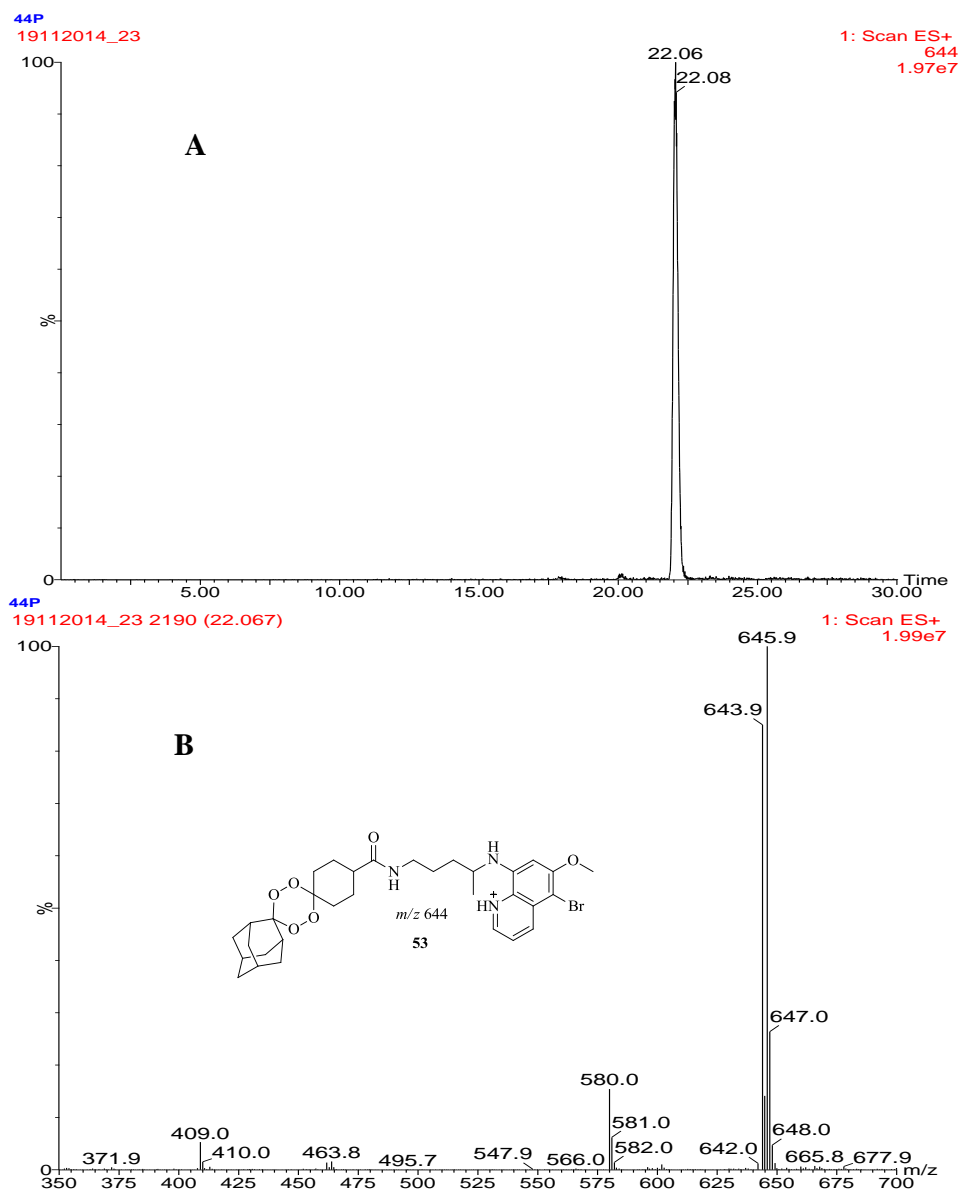


Figura 71 – A) Cromatograma e B) Espectro de massa da molécula protonada do composto **53** com  $t_r = 22,06$  min

O cromatograma obtido ao comprimento de onda de 265nm, para as amostras correspondentes às misturas reacionais  $t_{0h}$ ,  $t_{1h}$  e  $t_{2h}$  mostram que o pico do composto detetado com um  $t_r=22,06$  min na mistura reacional  $t_{0h}$ , já não é detetado ao fim de 1h. Os cromatogramas do ião extraído  $m/z$  644, nos diferentes intervalos de tempo ( $t_{0h}$ ,  $t_{1h}$  e  $t_{2h}$ ), (figura 72), confirmam este resultado.

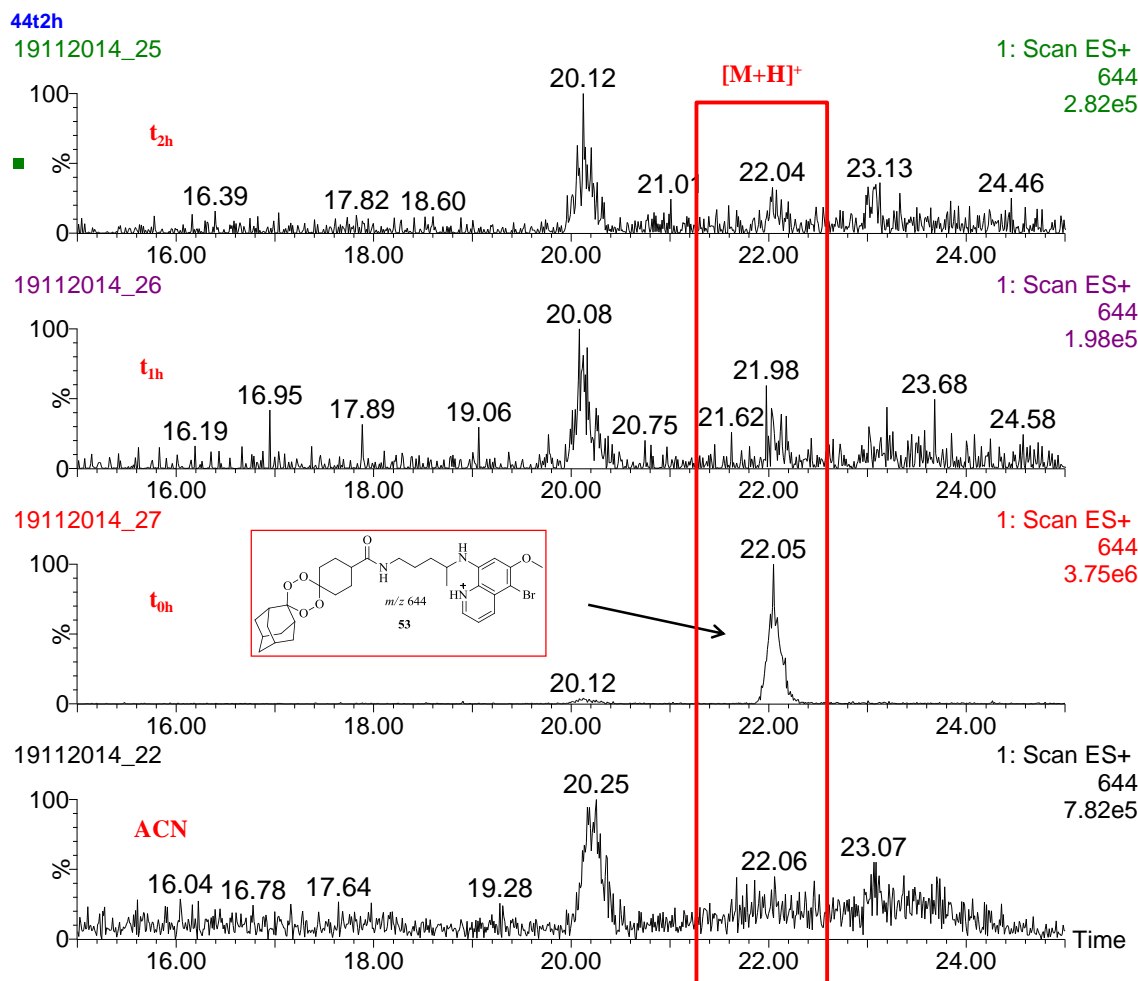
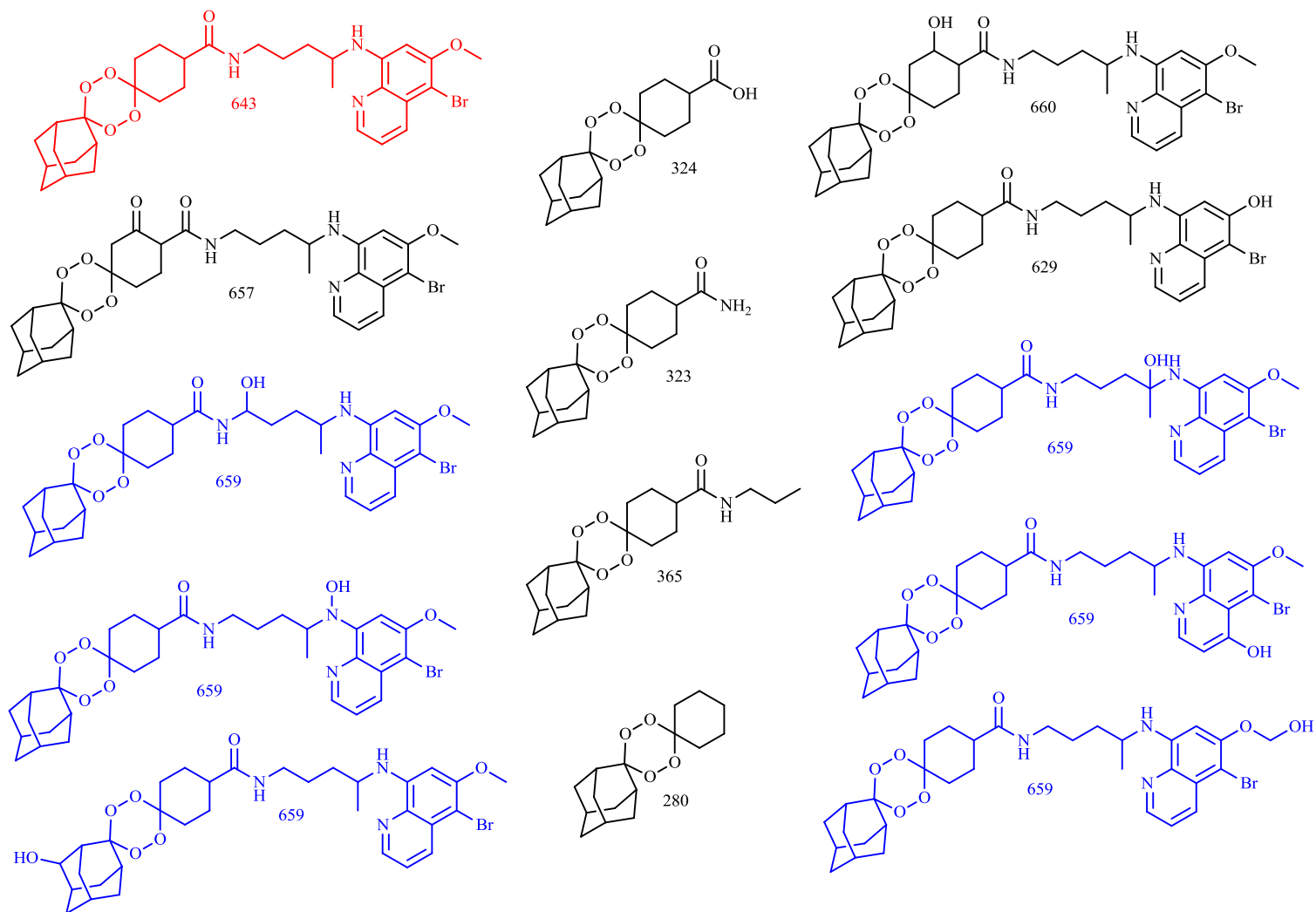


Figura 72 – Cromatograma do ião extraído  $m/z$  644 nas misturas reacionais  $t_{0h}$ ,  $t_{1h}$  e  $t_{2h}$ , do composto **53**

A formação de metabolitos foi pesquisada por comparação dos cromatogramas, nos diferentes tempos de reação. Como resultado desta avaliação não foram detetados picos novos, que pudessem estar relacionados com o composto em estudo.

Também, neste composto, regista-se a formação do pico  $m/z$  287, com o mesmo  $t_r$  e também com a mesma tendência para o aumento de intensidade (78%), ao fim de 2h de ensaio.

A pesquisa de metabolitos foi efetuada, tal como no composto **52**, pelo modo de monitorização seletiva de iões (SIM), incidiu sobre os metabolitos sugeridos pelo *software MetaPrint2D* (figura 73) e foi efetuada para os  $m/z$  281, 324, 325, 366, 630, 658, 660 e 662.



**Figura 73** – Metabolitos previstos para a molécula protonada do composto **53** de acordo com o *software* *MetaPrint2D*

Os resultados obtidos permitiram detetar a presença de um ião  $m/z$  660, cuja massa corresponde à  $[(M+H)+16]^+$ , isto é a um presumível derivado hidroxilado, cujas estruturas sugeridas para esse composto são indicadas a azul na figura 73.

A fragmentação de  $m/z$  660, efetuada com o objetivo de confirmar a identidade do metabolito com o do composto **53** foi efetuada com uma energia de colisão de 40eV. (figura 74)

Os resultados obtidos permitiram concluir que o padrão de fragmentação de  $m/z$  660 não é similar ao perfil de fragmentação do composto **53** (esquemas 18 e figura 61)

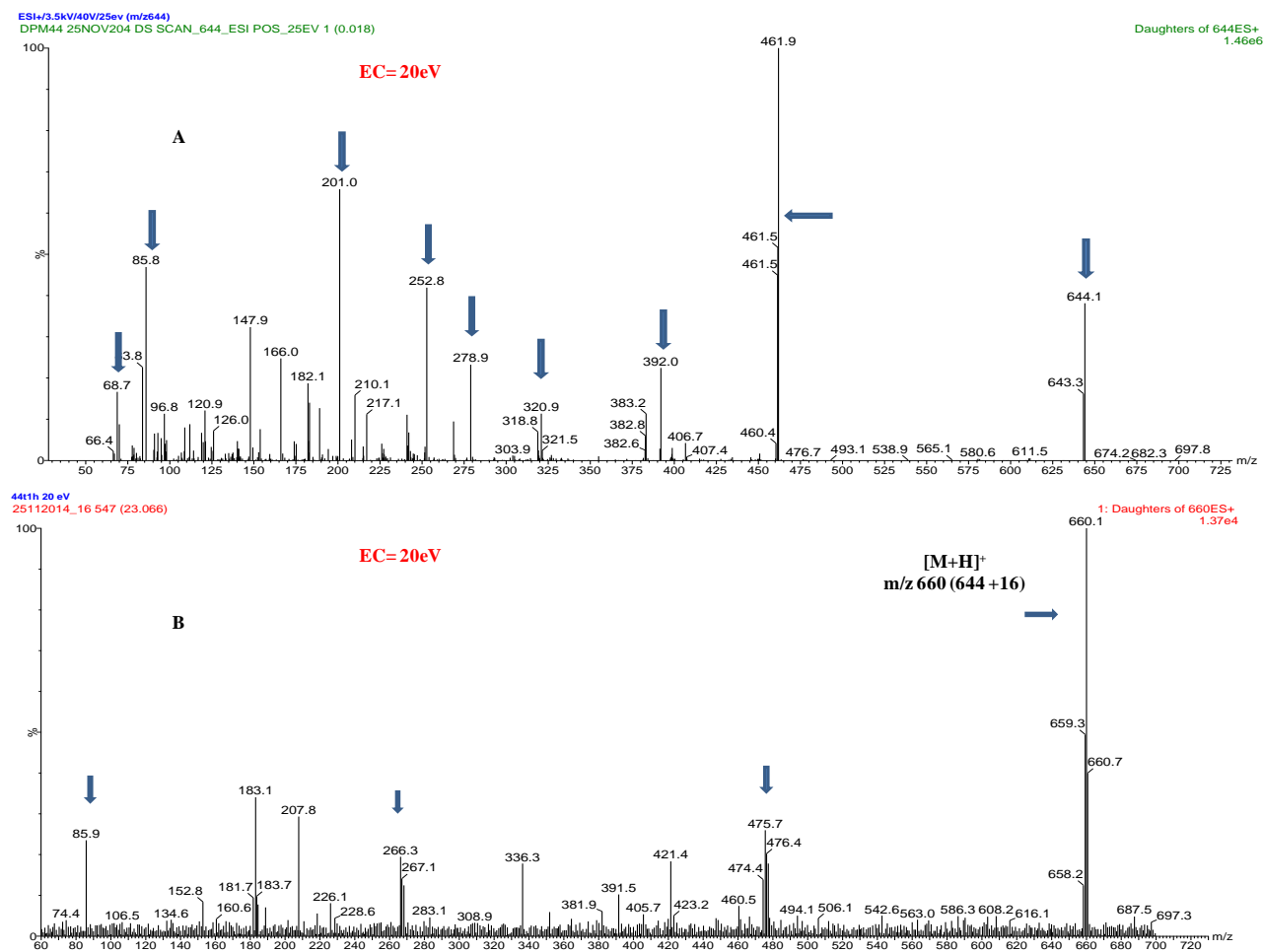


Figura 74 – Padrão de fragmentação das moléculas protonadas dos compostos na mistura reacional  $t_{1h}$ : A) de **53** quando aplicada a energia de colisão de 25eV; B) de  $m/z$  660 quando aplicada a energia de colisão a 20eV

Este resultado leva-nos a concluir que o  $m/z$  660 detetado ao tempo de análise de 23,06min, não é um metabolito hidroxilado, que se forma após 1h de incubação do composto **53** em enzimas hepáticas.

### 3.3.1.3 – Identificação Estrutural dos Metabolitos do Composto **54**

O cromatograma, apresentado na figura 75A, corresponde à análise de uma solução preparada com o composto **54**. A identificação do composto foi efetuada com base no espectro de massa do ião extraído apresentado na figura 75B

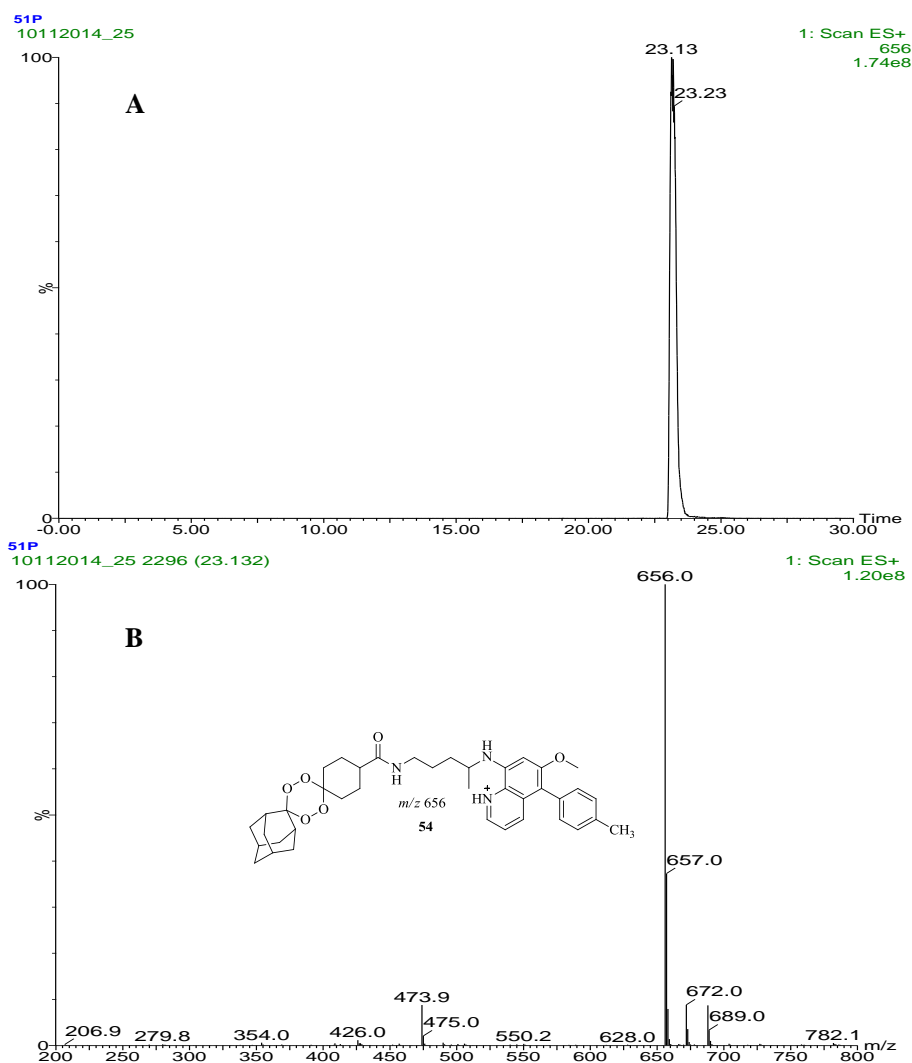


Figura 75 – A) Cromatograma e B) Espectro de massa da molécula protonada do composto **54** com  $t_r = 23,13$  min

O cromatograma obtido ao comprimento de onda de 265nm mostra o pico do composto



$m/z$  656 detetado com  $t_r=23,13\text{min}$  na mistura reacional  $t_{0h}$ , mas que já não é detetado ao fim de 2h. Este resultado é confirmado pelos cromatogramas do ião extraído  $m/z$  656, nos diferentes intervalos de tempo ( $t_{0h}$ ,  $t_{1h}$  e  $t_{2h}$ ), representados na figura 76.

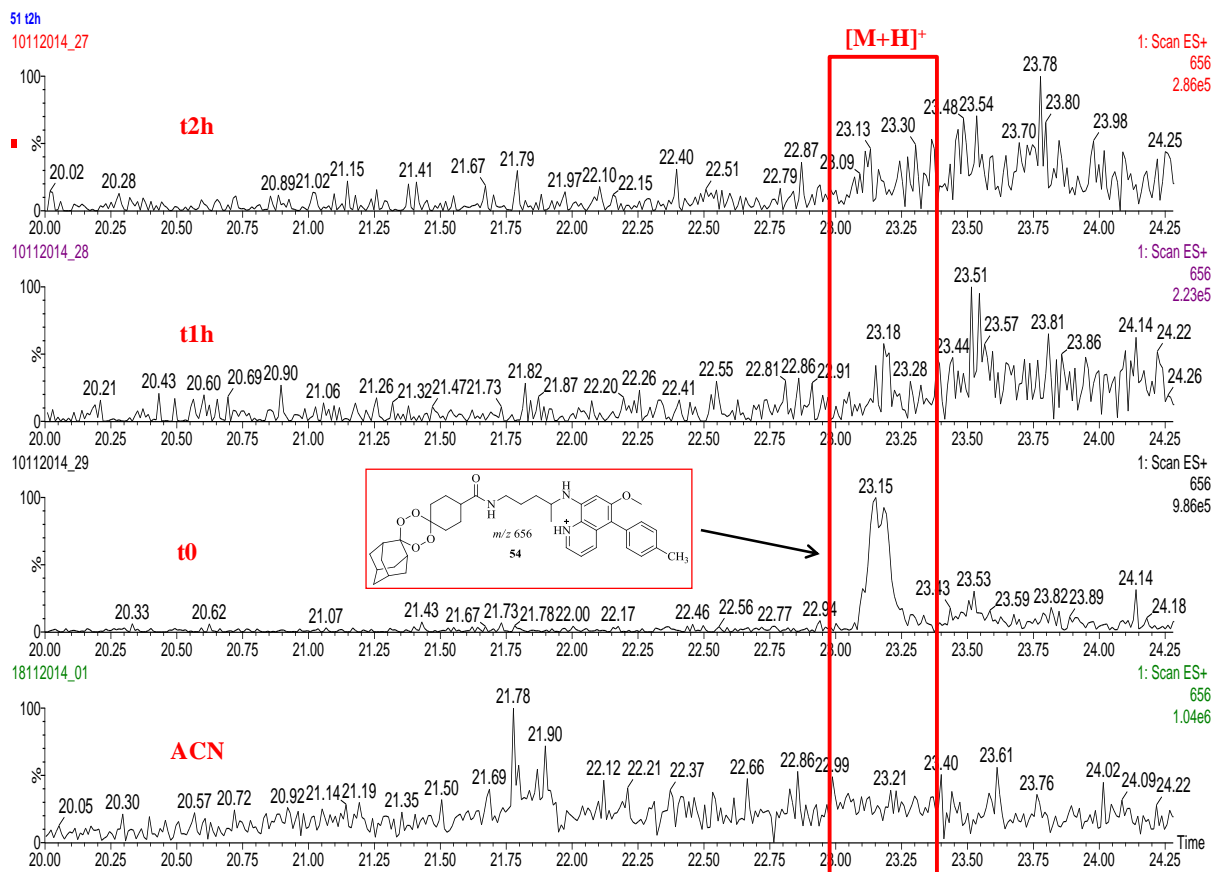


Figura 76 - Cromatogramas do ião extraído  $m/z$  656, nas misturas reacionais  $t_{0h}$ ,  $t_{1h}$  e  $t_{2h}$ , do composto **54**

Os espectros de massa, na figura 77, correspondentes ao pico detetado nos cromatogramas, contrariamente ao esperado, não mostram  $m/z$  656 correspondente à molécula protonada, mas é detetado o  $m/z$  672 que pode corresponder a  $[(M+H)+16]^+$ , isto é, a um presumível derivado hidroxilado. A intensidade deste pico vai reduzindo ao longo do ensaio (de 33,2% no  $t_{0h}$  a 6,2% no  $t_{2h}$ ), o que nos leva a pressupor não se tratar de metabolito, resultante da hidroxilação de **54**.

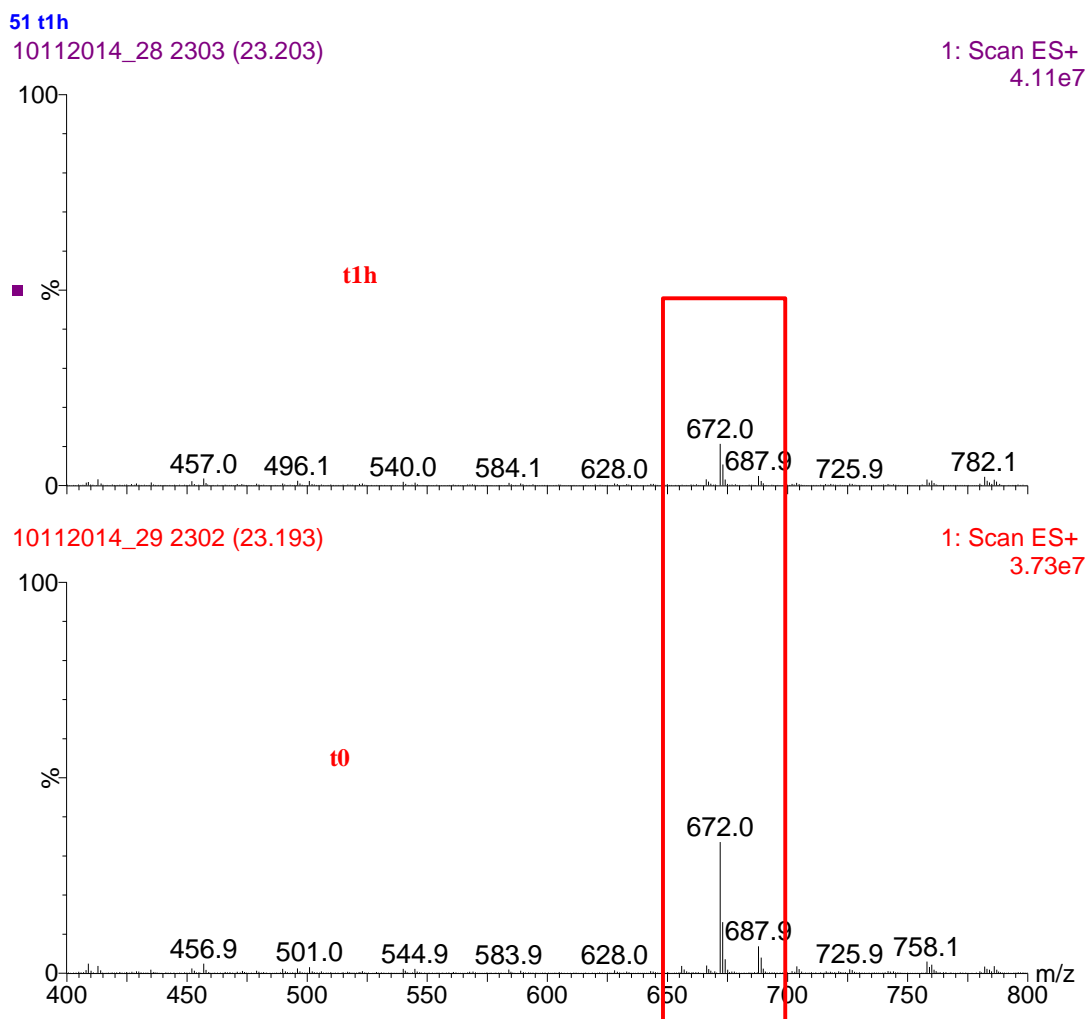


Figura 77 – Espectro de massa da molécula protonada do composto 54

Com o objetivo de explicar o porquê da formação deste composto  $m/z$  672 foram efetuadas algumas experiências que consistiram na pesquisa do ião extraído  $m/z$  656 após infusão direta do composto, nas mesmas concentrações, dissolvido em: *i*) ACN; *ii*) na fase móvel empregue no estudo da estabilidade metabólica que consistiu em 80% de ACN:20% ( $H_2O+0,5\%$  HCOOH); *iv*) na fase móvel empregue nos estudos por LC-MS/MS, nas proporções de 1% de ACN:99% ( $H_2O+0,5\%$  HCOOH) e 99% de ACN:1% ( $H_2O+0,5\%$  HCOOH). Os resultados obtidos permitem-nos concluir que a formação do composto hidroxilado  $m/z$  672 ocorre sob as condições do sistema de eluição usado. O cromatograma B na figura 78, que apresenta um pico  $m/z$  672 com a abundância relativa de 6%, reflete as condições de ensaio nos primeiros 20 min de análise. Nestas condições a fase móvel é basicamente constituída por 99% de água acidificada com 0,5% de HCOOH.

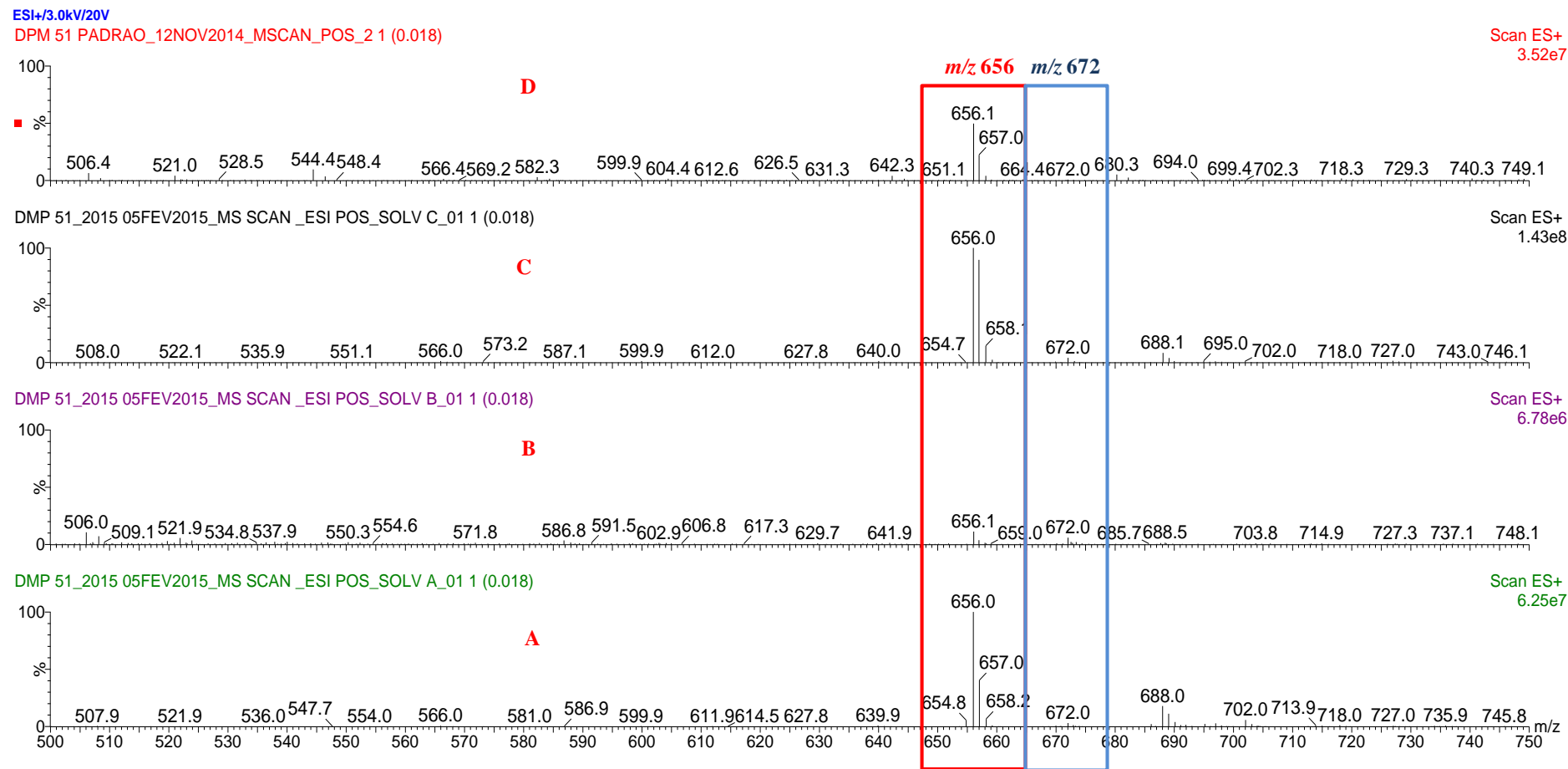


Figura 78 – Espetros de massa obtido após infusão direta de **54** em: A) 80%de ACN + (20% $\text{H}_2\text{O}$  +0,5%  $\text{HCOOH}$ ), B) 1%de ACN + (99% $\text{H}_2\text{O}$  +0,5%  $\text{HCOOH}$ ); C) 99%de ACN + (1% $\text{H}_2\text{O}$  +0,5%  $\text{HCOOH}$ );D) ACN

A pesquisa de metabolitos foi efetuada por comparação dos cromatogramas, nos diferentes tempos de reação ( $t_{0h}$ ,  $t_{1h}$  e  $t_{2h}$ ). Como resultado desta avaliação não foram detetados picos novos, que pudessem estar relacionados com o composto em estudo, à exceção do pico  $m/z$  287 (figura 67), com  $t_r=17,4min$  e com a mesma tendência para o aumento de intensidade (78%), ao fim de 2h.

A pesquisa de  $m/z$  307, 321, 642, 672, 686 e 688 correspondentes a possíveis metabolitos de **54**, também sugeridos pelo *software MetaPrint2D*, (figura 79) foi, tal como nos compostos anteriores efetuada por SIM.

Os resultados obtidos permitiram detetar na mistura reacional  $t_{2h}$  a formação de um metabolito,  $m/z$  688 com o  $t_r=19,6min$  cuja estrutura sugerida é na figura 79 indicada a azul. A confirmação da identidade do metabolito di-hidroxilado foi, tal como nos casos anteriores, efetuada através da fragmentação, a energias de colisão de 20 e 30eV, conforme ilustrado na figura 80.

Os resultados obtidos permitiram concluir que o perfil de fragmentação de  $m/z$  688, no esquema 22, correlaciona-se com o perfil de fragmentação de  $m/z$  656, molécula protonada do composto **54**, (esquema 18 e figura 61)

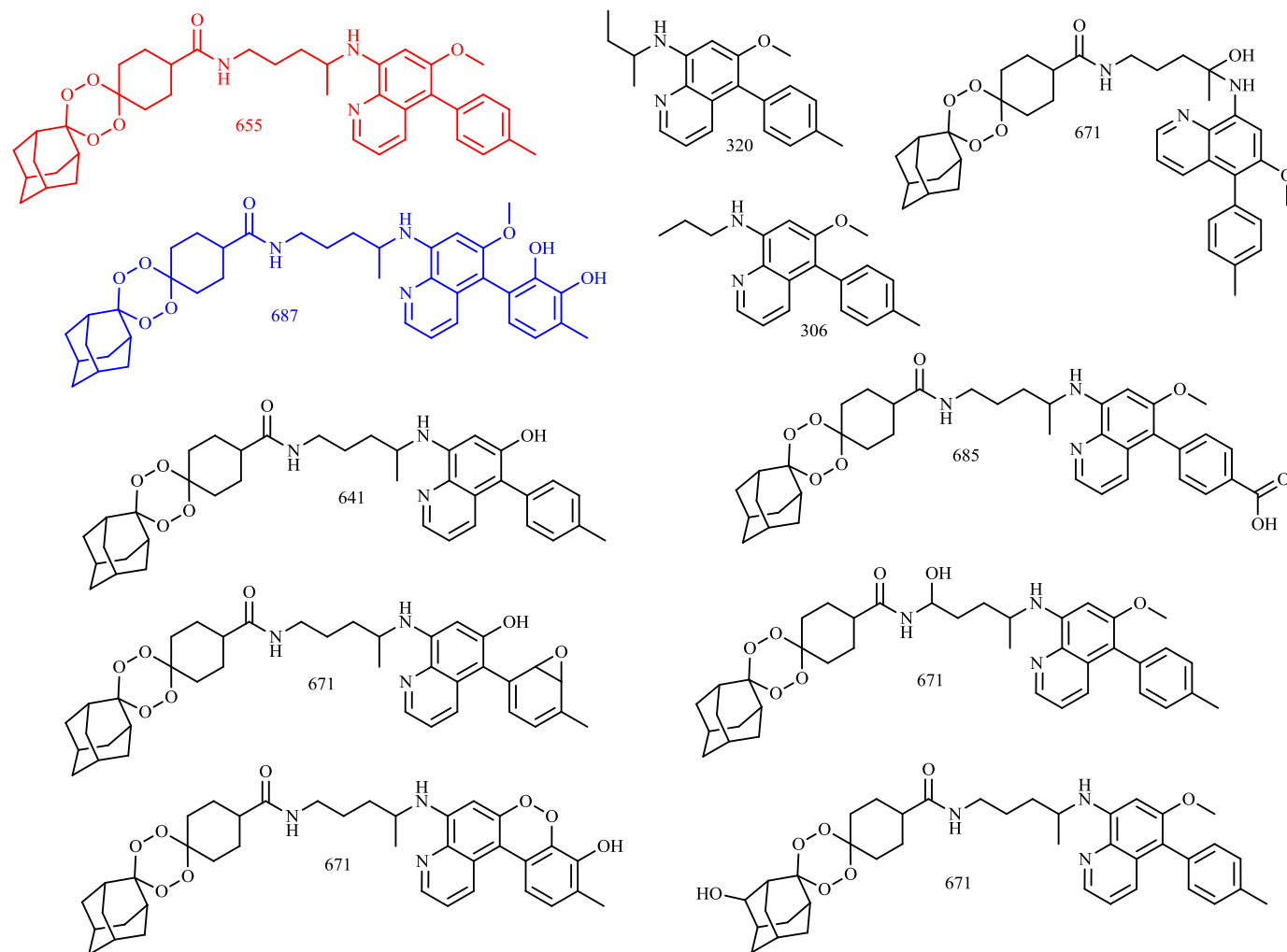


Figura 79 - Metabolitos previstos para o composto **54**, de acordo com o *software* *MetaPrint2D*

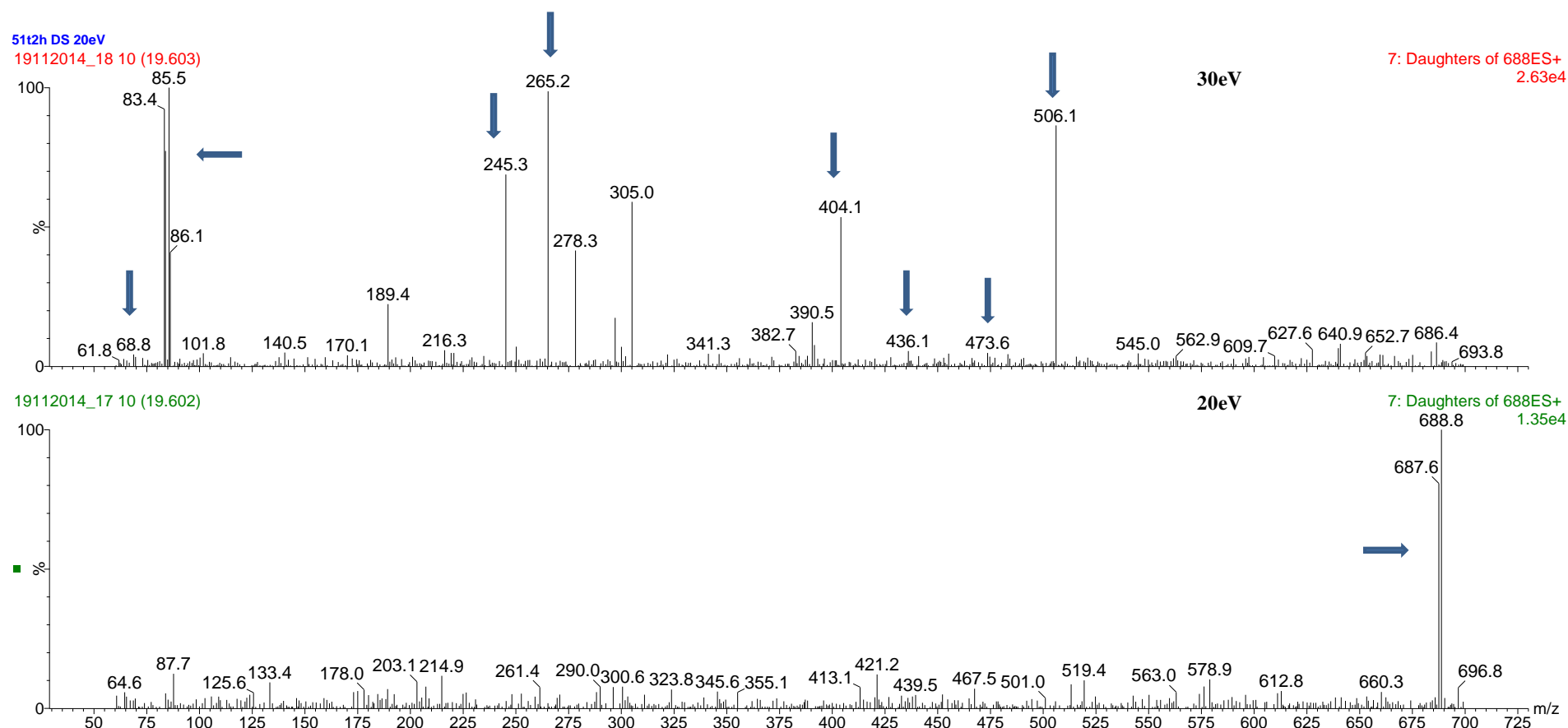
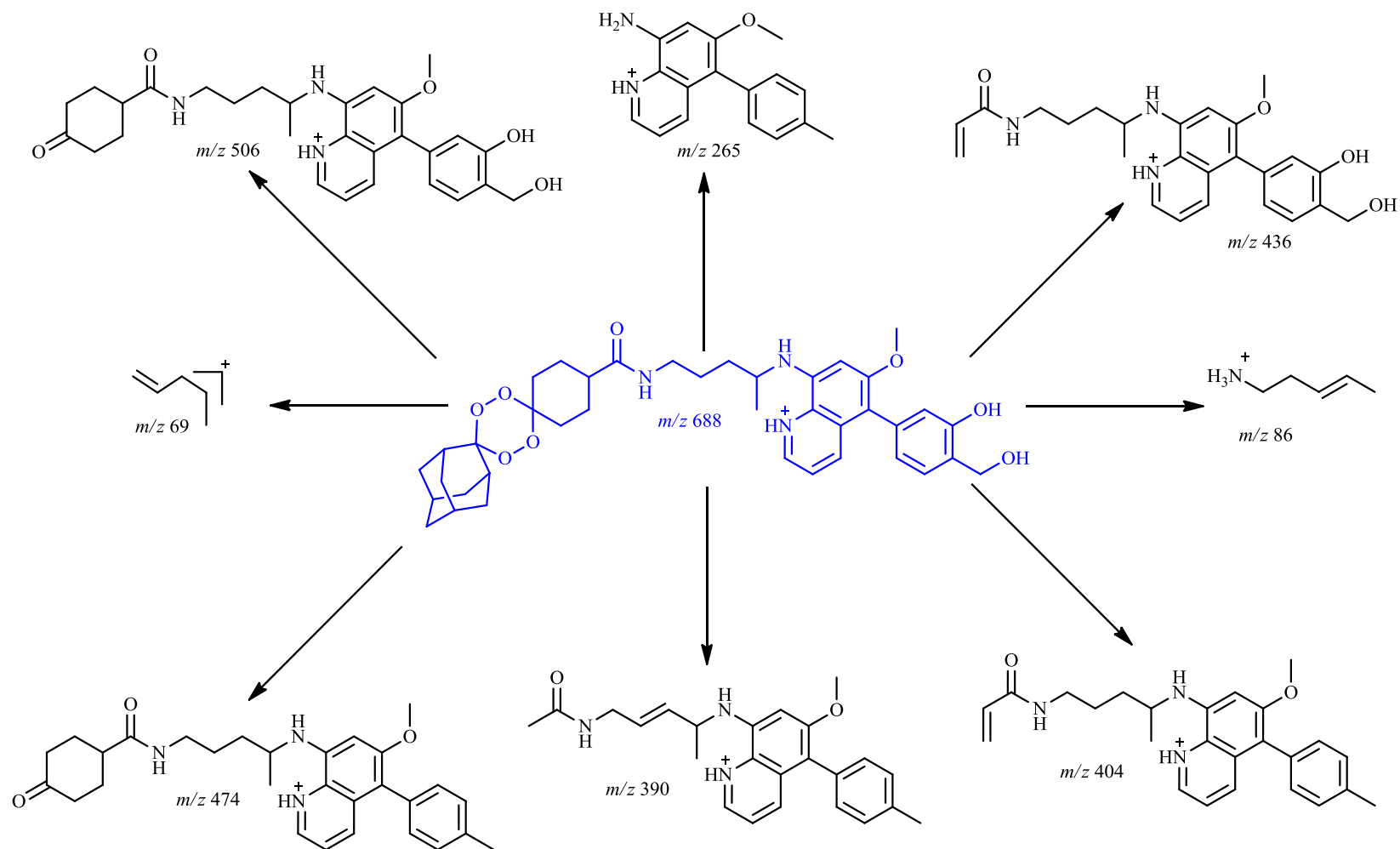
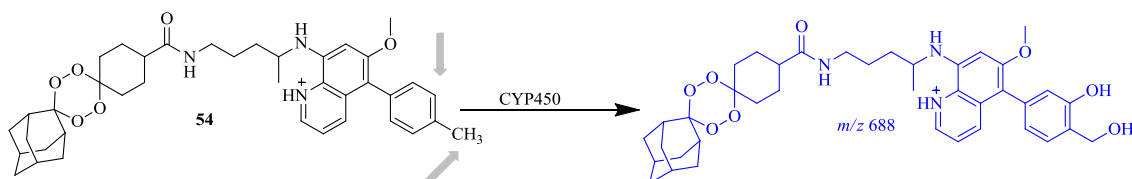


Figura 80 – Espectro MS/MS do metabolito  $m/z$  688 na mistura reacional  $t_{2h}$  obtido por aplicação de energias de colisão entre 20 e 30eV



Esquema 22 – Padrão de fragmentação do metabolito  $m/z$  688 na mistura reacional  $t_{2h}$  quando aplicada uma energia de colisão entre os 20 e 30eV

A metabolização de **54** ocorre de acordo com a via proposta no esquema 23.



Esquema 23 – Via de metabolização de **54**, conducente à formação do metabolito  $m/z$  688

Estruturalmente, o composto **52** diferencia-se do **54** por não possuir a cadeia endoperoxídica. Por isso, paralelamente à pesquisa de metabolitos sugeridos para o composto **54**, foi também pesquisado, nas misturas reacionais  $t_{1h}$  e  $t_{2h}$  o metabolito  $m/z$  333 detetado no composto **52** pelo método do ião extraído. Porque o  $m/z$  333 detetado no composto **52** não foi encontrado no **54**, os resultados obtidos sugerem, de alguma forma, que a ligação do tetraoxano à aminoquinolina altera o perfil de metabolização do composto.

#### 3.2.1.4 – Identificação Estrutural dos Metabolitos do Composto 55

Tal como se efetuou para os compostos **52-54**, o cromatograma na figura 81A, permitiu detetar o composto aos 20,65min de análise. O espectro de massa (figura 81B) confirma a presença da molécula protonada  $m/z$  566.



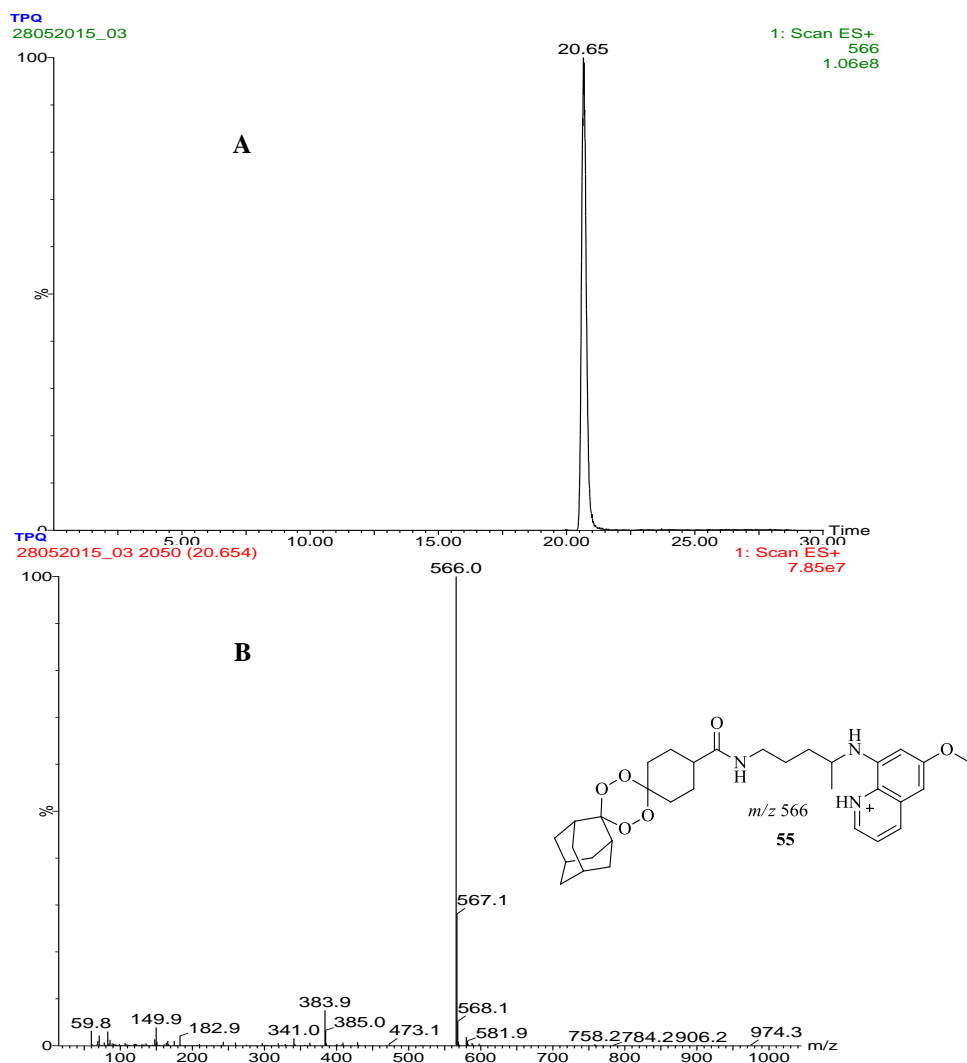


Figura 81 – A) Cromatograma e B) Espectro de massa da molécula protonada do composto **55** com  $t_r = 20,54$  min

O cromatograma obtido ao comprimento de onda de 265nm mostra o pico de absorção do composto somente na alíquota do  $t_{0h}$ . Este resultado é também confirmado pelos cromatogramas do ião extraído nas misturas reacionais  $t_{0h}$ ,  $t_{1h}$  e  $t_{2h}$  na figura 82.

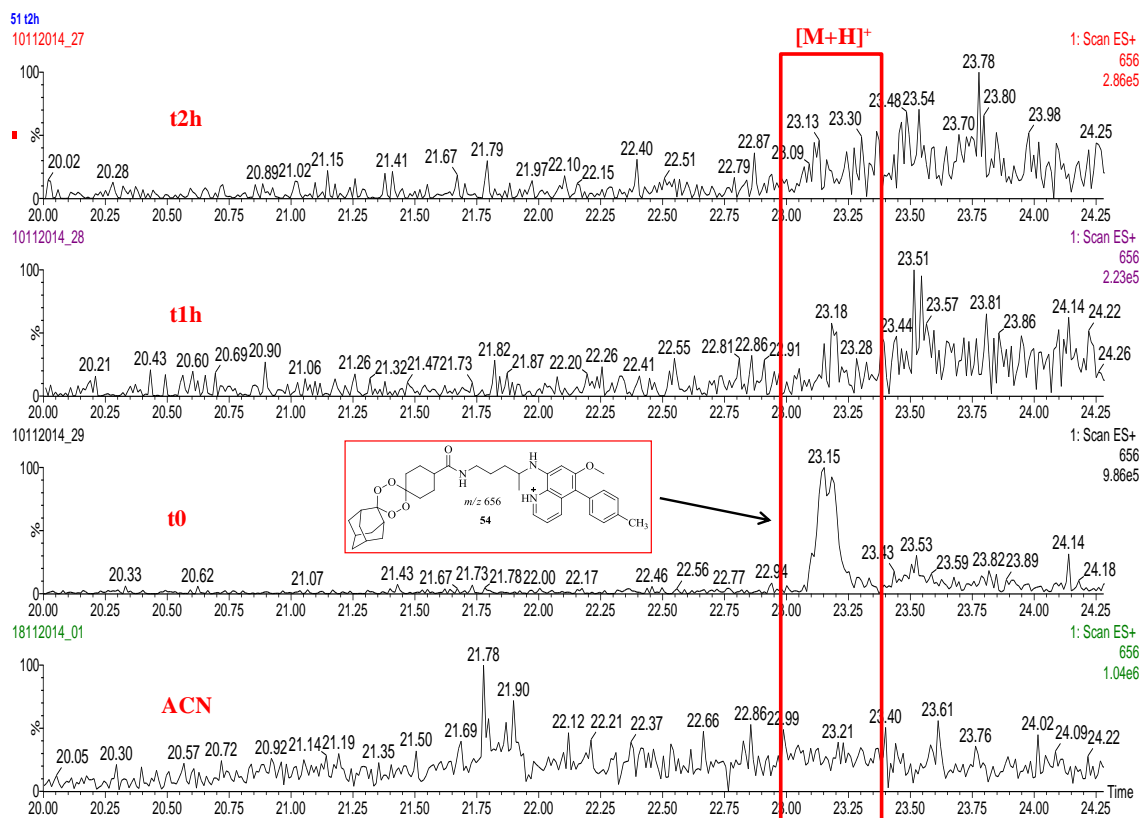


Figura 82 – A: Cromatogramas do ião extraído  $m/z$  566 nas misturas reacionais  $t_{0h}$ ,  $t_{1h}$  e  $t_{2h}$ , do composto **55**

A análise dos cromatogramas das misturas reacionais  $t_{1h}$  e  $t_{2h}$ , permitiu observar a formação de picos novos nos  $t_r = 13,3$ ,  $15,8$ , e  $18,37$  min cujos iões produto formados após fragmentação, não se correlacionam, com a estrutura do composto em estudo. De entre os novos compostos detetados destaca-se uma vez mais a molécula protonada  $m/z$  287, com o mesmo  $t_r = 16,5$  min observado em todos os outros derivados tetraoxanos, submetidos a este estudo. Aos 7,59 min foi também observado, em todas as misturas reacionais um pico  $m/z$  260, cuja presença foi também detetada na solução do composto **55**. O  $m/z$  260 também corresponde à molécula protonada da PQ, o que leva a presumir que a sua presença seja possivelmente, devida ao facto de ser um produto de partida para a síntese de **55**. Este pico foi analisado, porque em relação ao pico  $m/z$  260 da solução do composto **55** observou-se o aumento da sua área na ordem dos 87%, na mistura reacional  $t_{0h}$ . Com o objetivo de se proceder a sua identificação foi também analisada, nas mesmas condições de ensaio, uma solução de PQ neutra que apresentou um  $t_r = 7,47$  min (figura 83).

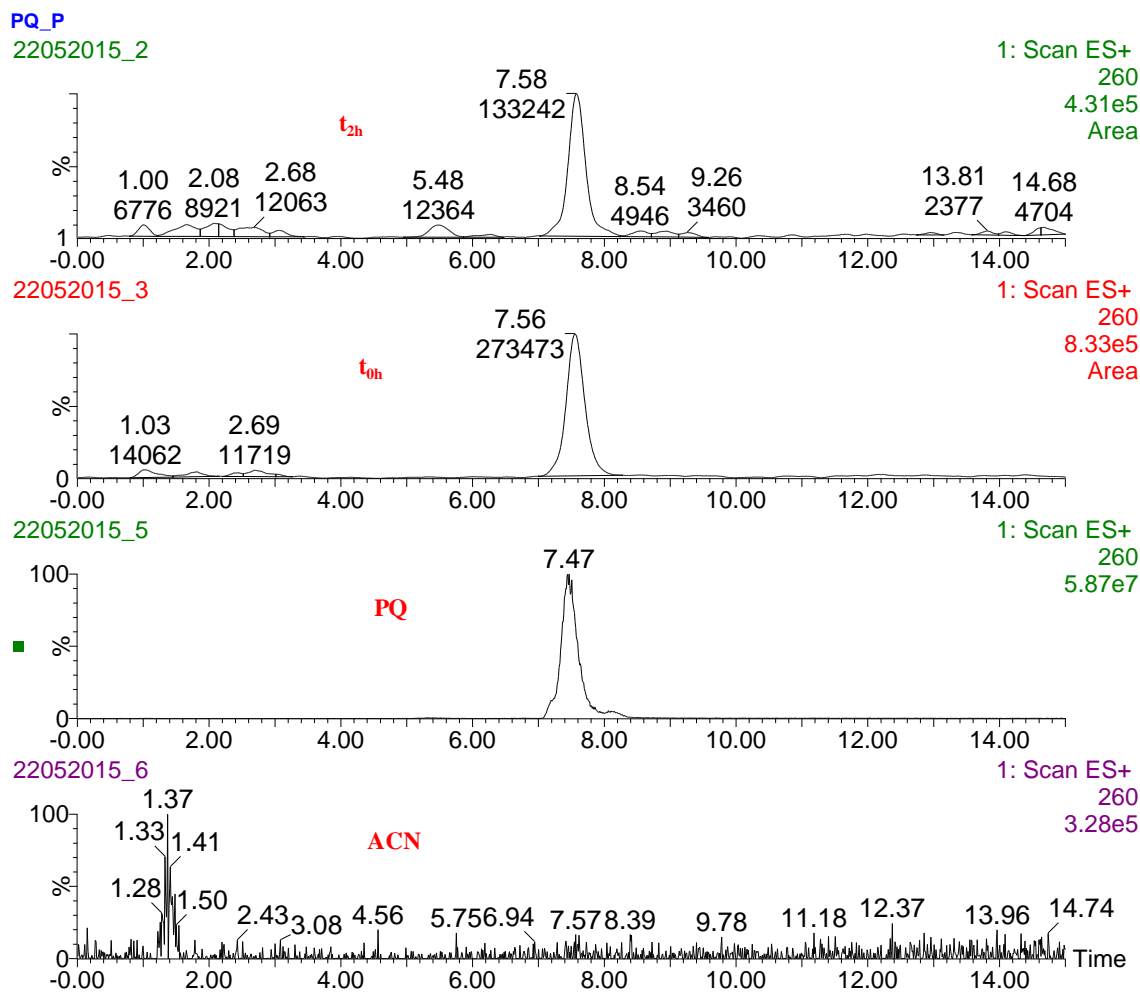
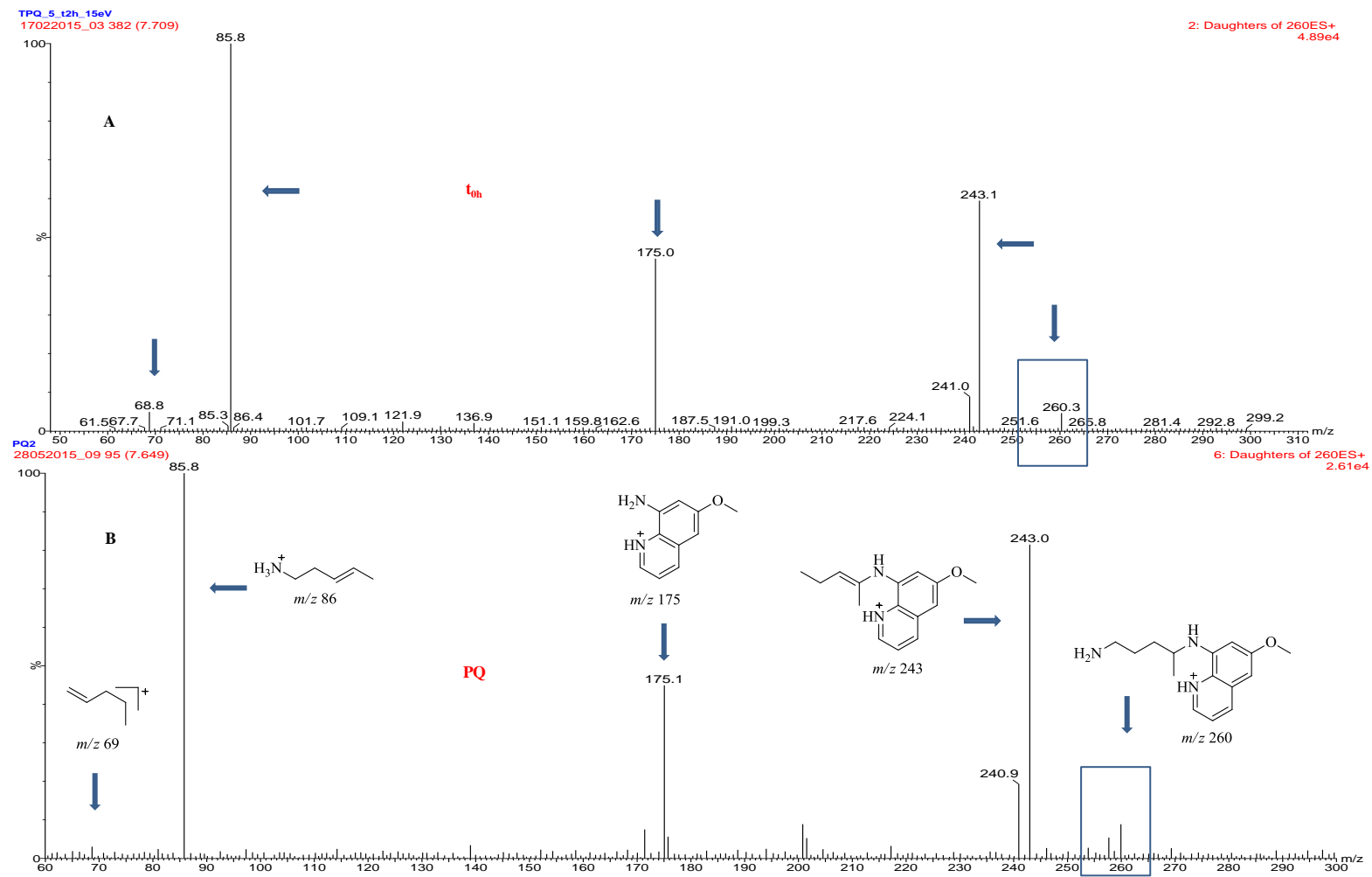


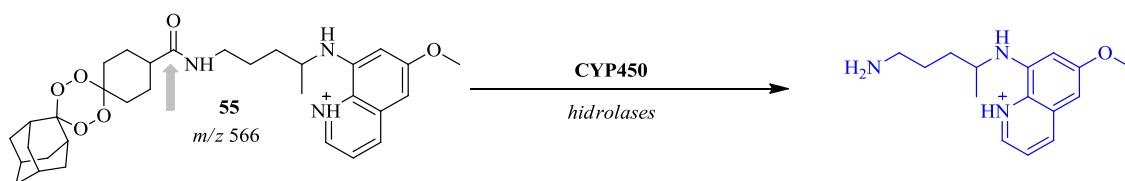
Figura 83 – A: Cromatogramas do ião extraído  $m/z$  260 na solução da PQ e nas misturas reacionais  $t_{0h}$ , e  $t_{2h}$

Os espectros MS/MS de  $m/z$  260, nas alíquotas  $t_{0h}$ ,  $t_{1h}$  e  $t_{2h}$  a energias de colisão entre 10 e 25eV mostram que o seu padrão de fragmentação, na figura 84A, apresenta semelhanças com o perfil de fragmentação da PQ (figura 84B) e com o do composto **55**  $m/z$  566 (figura 61 e esquema 18)


 Figura 84 – Espectro MS/MS de  $m/z$  260 A) na mistura reacional  $t_{0h}$  e B) na solução da PQ obtido a uma energia de 15eV

Apesar de se notar, entre as alíquotas  $t_{0h}$ , e  $t_{2h}$ , uma tendência para a redução da área de  $m/z$  260 na ordem dos 47%, os resultados obtidos levam a concluir que este composto detetado na mistura reacional  $t_{0h}$  corresponde a um possível metabolito com as características estruturais da PQ.

De acordo com o mecanismo proposto no esquema 24 este possível metabolito forma-se por hidrólise num sistema microsomal que contém *hidrolases*, nomeadamente *esterases*, para além das enzimas do citocromo P450.



Esquema 24 – Via de metabolização da molécula protonada de **55**, conducente à formação do metabolito  $m/z$  260.

A pesquisa de outros metabolitos, sugeridos pelo *software MetaPrint2D*, nomeadamente  $m/z$  382, 566, 580, 582, foi efetuada, tal como nos casos anteriores, por SIM. Os resultados obtidos não revelam a formação de outros metabolitos nas condições de ensaio empregues.

No presente trabalho procedeu-se à pesquisa de metabolitos formados após duas horas de incubação dos compostos em microsomas de fígado de rato. Os compostos submetidos ao estudo, estruturalmente, apresentam diferenças que irão permitir avaliar a sua influência no perfil de metabolização.

Com base nos tempos de retenção e nos espectros de massa obtidos foram confirmados os compostos nas misturas de incubação. A formação de metabolitos baseou-se na monitorização da redução da área dos picos cromatográficos correspondentes a cada uma das moléculas precursoras e na pesquisa de picos novos pelo modo de monitorização seletiva de iões (SIM). A identidade dos metabolitos detetados foi confirmada com base na semelhança dos seus perfis de fragmentação com o das moléculas precursoras.

Os resultados obtidos revelaram a formação de metabolitos com diferentes características e permitiram concluir:

1. Comparando os comportamento dos compostos **52** e **54**, nas misturas de incubação pode-se constatar que a ausência do núcleo de tetroxano não só confere maior estabilidade metabólica ao composto **52** ( $t_{1/2}=130\text{min}$ ), como também influencia a metabolização, para favorecer, no composto **52**, a formação de um possível metabolito resultante da remoção do grupo terminal  $\text{NH}_2$ , no farmacóforo PQ. No composto **54** foi detetado um metabolito di-hidroxilado.
2. A incorporação de um halogenio, Br no caso do composto **53**, na posição de bloqueio da toxicidade, nos derivados híbridos tetraoxanos, não altera de forma significativa a velocidade de metabolização observada no composto **55**, que não possui substituinte na posição 5 do anel quinolínico. No composto **53** não foi detetado nenhum metabolito. No composto **55** foi detetado um metabolito com as características estruturais da PQ
3. Para cada um dos possíveis metabolitos identificados nas misturas reacionais dos compostos **52**, **54** e **55** foi proposta uma via de metabolização, que sugere a participação de outras enzimas específicas (*amidases*, *hidrolases/estearases*), para além do sistema microssomal que contém as enzimas do citocromo P450.
4. Apesar das diferenças estruturais entre os compostos **52-55**, a molécula protonada  $m/z$  287 foi encontrada em todos os compostos analisados o que poderia sugerir que o mesmo partilha semelhanças estruturais comuns a todos os compostos. Este composto não foi considerado metabolito, uma vez que os iões produto formados após a sua fragmentação não se correlacionam com a estrutura de nenhum dos compostos estudados.

# **CAPITULO IV**

---

## **Conclusões**





## 4 - Conclusões

A espectrometria de massa foi no presente trabalho aplicada no estudo de duas séries de compostos antimaláricos derivados das 8 aminoquinolinas, nomeadamente *i*) as quinolon-4(1*H*)-iminas e *ii*) os derivados híbridos que combinam endoperóxidos derivados da artemisinina e farmacóforos das 8-aminoquinolinas PQ-ART.

Os derivados das quinolon-4(1*H*)-iminas, submetidos ao presente estudo, diferenciam-se entre si pelo substituinte ligado ao azoto do anel da quinolina (posição 1) que pode ser um grupo etilo (compostos **40** e **41**) ou uma *N*-alquilamina (compostos **42-51**). Ambas as séries têm como substituinte na posição 7 do anel quinolínico um átomo de Cl ou CF<sub>3</sub>.

Os estudos conduzidos por espectrometria de massa mostram que as diferenças estruturais e a natureza dos substituintes no anel da quinolina influenciam o comportamento dos compostos quando submetidos a condições variáveis do potencial de cone (SP), na fonte de ionização, ou de energia de colisão, no analisador.

De um modo geral, a fragmentação destes compostos caracteriza-se pela *N*-desalquilação, sendo a que ocorre na fonte de ionização bastante simples, para ambas as séries de compostos. As moléculas protonadas de **40** e **41**, quando comparadas com as dos compostos **42-51** apresentam maior estabilidade.

O estudo do comportamento destes compostos na câmara de colisão foi conduzido em dois tipos de equipamento: analisador do tipo QQQ e analisador de armadilha de iões-QIT. Os resultados obtidos no QQQ mostram um padrão de fragmentação bastante extenso e complexo para as moléculas protonadas dos compostos **40** e **41**, (esquema 12) e simples, com dois a três fragmentos, dependendo do comprimento da cadeia alquílica, nos compostos **42-51** (esquema 13). Comparando os resultados obtidos nos dois tipos de equipamento empregues pode-se considerar que a fragmentação no analisador do tipo QQQ, proporciona mais fragmentos e, consequentemente, mais informação relativa à caracterização estrutural dos compostos estudados. No entanto, os resultados obtidos no QIT (tabela 2) não só confirmam os fragmentos e o mecanismo de fragmentação dos compostos, como também proporcionam informação adicional sobre o efeito do comprimento da cadeia *N*-alquílica e sobre o efeito electroatractor do substituinte (X=Cl ou CF<sub>3</sub>) na posição 7 do anel quinolínico: Isto é quanto menor for o comprimento da

cadeia *N*-alquílica e quanto maior for o efeito electroatractor do substituinte halogenado, maior é a estabilidade dos compostos quando sujeitos a valores crescentes de energias de colisão.

O estudo da estabilidade dos compostos em enzimas hepáticas mostra que os derivados *N*-alquílicos **40** e **41** sofrem metabolização após 4 horas de incubação em microssomas de fígado de rato. Os derivados *N*-alquilaminas **42-51** exibem maior estabilidade, com a maioria dos compostos apresentando uma taxa de metabolização insignificante depois de 6 horas de incubação. Os resultados obtidos também sugerem que o fluxo de metabolização destes compostos não é significativamente afetado pelo comprimento da cadeia aminoalquílica, ou pela natureza dos substituintes no anel quinolínico, reforçando a ideia de que a extensão da cadeia entre os átomos de azoto do anel quinolínico e da cadeia alquílica é uma abordagem eficaz para a remoção da fonte de reatividade verificada nos derivados *N*-alquílicos **40** e **41**.

Os compostos revelaram estabilidade em tampão fosfato (com o sistema de regeneração ausente NADPH), sugerindo a não ocorrência de metabolismo, dependente de não cofatores, que pudesse contribuir para a sua metabolização em microssomas de fígado de rato.

A identidade dos metabolitos formados após incubação dos compostos nos microssomas de fígado de rato foi confirmada com base na semelhança do seu perfil de fragmentação com o das moléculas precursoras. Na série dos derivados das quinolon-4(1*H*)-iminas foram detetados metabolitos resultantes da *N*-desalquilação (compostos **40** e **41**) e hidroxilação (**40** e **44**). As vias de metabolização propostas, conducentes à formação desses metabolitos, são apresentadas no esquema 14.

Os derivados endoperóxidos híbridos da primaquina e artemisinina PQ-AR, são estruturalmente constituídos por farmacóforos tetraoxanos e 8-aminoquinolinas, ligados através de um grupo amida de modo a formarem uma única entidade química. Diferem estruturalmente, entre si, pela ausência da cadeia endoperoxídica **52**, ou pelo substituinte R (**53**, **54** e **55**) na posição 5 do anel quinolínico introduzido com o objetivo de bloquear a hidroxilação da PQ, nessa posição e aumentar a sua estabilidade.

O estudo destes compostos no analisador do tipo triplo quadrupolo (QQQ) foi efetuado com o objetivo de avaliar se a estabilidade dos mesmos, na fonte de ionização e no analisador é influenciada pela: *i*) presença do substituinte na posição 5 do anel quinolínico *ii*) natureza desses substituintes e *iii*) introdução da cadeia endoperoxídica.

Os resultados obtidos na fonte de ionização mostram que a presença da cadeia endoperoxídica e do substituinte na posição de bloqueio contribuem para uma maior estabilidade dos compostos e particularmente para o aumento da estabilidade do farmacóforo PQ quando submetido a potenciais de cone mais elevados.

Na câmara de colisão, estes compostos apresentam, de um modo geral, estabilidade bastante reduzida que se caracteriza pela fragmentação dos compostos a valores baixos de energia de colisão. O padrão de fragmentação mostra que a presença de substituintes na posição de bloqueio da toxicidade não influencia o comportamento destes compostos quando submetidos ao efeito crescente de energias de colisão. Também a presença da cadeia endoperoxídica não contribui para o aumento da estabilidade do farmacóforo das 8-aminoquinolinas.

Os mecanismos de fragmentação propostos no esquema 18 e na figura 61 para os compostos **53-55** e no esquema 19 e na figura 62 para o composto **52** permitiram estabelecer a estrutura dos fragmentos obtidos a partir das moléculas protonadas.

Os derivados híbridos PQ-ART exibem uma elevada taxa de metabolização em microsomas de fígado de rato. A sua estabilidade no sistema microsomal pode ser melhorada pela incorporação de um grupo (CH<sub>3</sub>) **54**, na posição *p*- do substituinte fenilo. Comparando a taxa de metabolização do composto **52**, com a do **54** pode-se concluir que a introdução da cadeia endoperoxídica reduz significativamente a estabilidade metabólica.

A pesquisa de metabolitos nos derivados tetraoxanos resultou na deteção e identificação de metabolitos com diferentes características, nos composto **52**, **54** e **55** e permitiu estabelecer as vias de metabolização que conduzem à formação desses metabolitos (esquemas 21, 23 e 24 respetivamente).

Concluindo, os metabolitos detetados pelo método LC-MS/MS em ambas as classes de derivados (quinolo-4(1*H*)-iminas e tetraoxanos), resultam da atividade das enzimas do citocromo P450 no radical do anel quinolínico da PQ.



# **CAPÍTULO V**

---

## **Parte Experimental**



## **5.1 – Procedimento Experimental para a Avaliação das Quinolon-4(1H)-iminas**

### **5.1.1 – Identificação e Caracterização Estrutural**

#### **5.1.1.1 -Equipamento**

##### **5.1.1.1.1 - Espectrómetro de Massa com Analisador do Tipo Triplo Quadrupolo (QQQ)**

Os ensaios foram efetuados num espectrómetro de massa MICROMASS QUATTRO MICRO API da Waters (Manchester, UK) com analisador do Triplo Quadrupole (QQQ) e com uma fonte de ionização por electrospray ESI.

As soluções dos analitos, à concentração 10 µM, foram infundidas, no modo positivo de iões, através de uma bomba de infusão a um fluxo de 10 µLmin<sup>-1</sup>. Todos os parâmetros instrumentais foram otimizados, a fim de melhorar a razão sinal-ruído. Resumidamente, o potencial do capilar foi ajustado para 2,5kV, o do cone de amostragem para 10V, e o do extrator para 1V. Os fluxos de gás do cone e de dessolvatação foram ajustados para 50 e 750Lh<sup>-1</sup>, respetivamente. A temperatura da fonte foi, ao longo dos ensaios, mantida a 120° C e a de dessolvatação foi fixada em 350°C. A Aquisição e o processamento de dados foram realizados utilizando o *software* MassLynx, versão 4.1 e as análises foram obtidas em modo de varrimento contínuo, na faixa de 60-800 *m/z*. As experiências no analisador foram realizadas utilizando Árgon (Ar) como gás de colisão a uma pressão de cerca 3×10<sup>-3</sup> mbar. A fragmentação foi induzida, por aplicação de energias de colisão (EC) entre os 0 e 45eV.

##### **5.1.1.1.1.1 - Otimização das Condições Analíticas no Espectrómetro de Massa do tipo QQQ**

O trabalho experimental iniciou-se pela otimização dos parâmetros relacionados com a formação do ião precursor que ocorre na fonte de ionização.

As soluções padrão de cada composto a analisar, foram diretamente infundidas na fonte ESI, através da bomba de infusão. Foram testados dois modos de ionização de íões: positivo e negativo. Foi escolhido o modo de ionização positivo.

Com o objetivo de se obterem íões precursores com maior intensidade de sinal e com o mínimo de fragmentação na fonte, foram de seguida otimizados o potencial de capilar (CP-*Capilar Potential*) e a voltagem de cone SP (*Source Potential*)

#### **a) Otimização da Voltagem do Capilar (CP) na Fonte de Ionização**

A partir da infusão da solução padrão de cada um dos compostos a analisar e com o objetivo de se obter um sinal de intensidade elevada, a voltagem aplicada no capilar (CP-*Capilar Potencial*) para formar os respetivos íões precursores foi testada, na fonte ESI, entre 0,5 e 5 kV, em modo positivo. O potencial do capilar escolhido foi o que proporcionou uma razão sinal ruído superior.

#### **b) Otimização da Voltagem do Cone na Fonte de Ionização**

Da mesma forma foi otimizada a voltagem a aplicar no cone (SP-*Source Potencial*), de modo a permitir uma razão sinal ruído superior. Fez-se também o estudo da fragmentação para potenciais mais elevados.

#### **c) Otimização das Condições no Analisador do Tipo QQQ**

Estabelecidas as condições ótimas de CP e SP, as experiências no analisador foram realizadas utilizando Árgon (Ar) (Gasin, Leça da Palmeira, Portugal) de pureza ultra elevada, como gás de colisão a uma pressão de cerca  $3 \times 10^{-3}$  mbar. A fragmentação foi induzida, por aplicação de energias de colisão (EC) entre os 0 e 45 eV.

##### **5.1.1.1.2 – Espectrómetro de Massa com Analisador de Armadilha de Íões - QITMS**

Com o objetivo de comparar o comportamento dos compostos na fonte e no analisador, as análises foram também conduzidas num espectrómetro de massa ESQUIRE 3000 Plus BRUKER DALTONICS, usando o mesmo tipo de fonte, mas com um analisador de armadilha de íões (*Quadrupole Ion Trape-QIT*). O princípio de



funcionamento deste analisador, conforme previamente descrito, consiste em isolar, o íon de interesse, no interior do analisador de armadilha de íões por projeção de todos os outros íões para fora da armadilha. Este íon é depois, acelerado, por efeito da aplicação de voltagens de elevada tensão e colide com o gás reagente. Os íões gerados pela fragmentação, em seguida, são detetados e analisados.

Os dados obtidos foram processados no *software* da Bruker Daltonics.

#### **5.1.1.1.2.1 - Otimização das Condições Analíticas no Espectrómetro de Massa com Analisador de Armadilha de Íões-QITMS**

##### **a) Otimização da Voltagem do Cone na Fonte de Ionização**

Neste equipamento, a otimização das condições analíticas foi feita variando o potencial do cone (SP), entre 107,1 e 251,5 V. A tensão aplicada no cone foi, para todos os compostos, otimizada para valores de 187,3V, correspondente à 600% da estabilidade dos compostos (*Compound stability- CS*).

##### **b) Otimização das Condições no Analisador do ITQ**

No analisador, o grau de fragmentação dependeu da amplitude da voltagem de alta tensão aplicada, cujos valores variavam de 0,5 a 1,2. Na fragmentação MS/MS<sup>n</sup> a amplitude de fragmentação foi empiricamente ajustada de modo a permitir que um sinal de intensidade baixa do íon precursor remanescesse visível no espectro do íon fragmento.

#### **5.1.1.2 - Material e Reagentes Gerais**

##### **5.1.1.2.1 - Material**

Nesta secção descreve-se o material específico utilizado na aplicação desta metodologia, e não são referidos materiais de uso corrente de laboratório

- Micropipetas de 10, 100, 1000 µL VWR *International*
- Vials de 1,5 mL, VWR *International*

- Seringas de 250  $\mu\text{L}$ , *Agilent Technologie*
- *Eppendorf* de 1000  $\mu\text{L}$

#### 5.1.1.2.2 – Reagentes

- ACN (acetonitrilo) (Fluka, Seelze, Alemanha) de grau de pureza LC-MS
- Ácido fórmico (Fluka), de grau LC-MS.
- Metanol- $d_1$  ( $\text{CH}_3\text{OD}$ ) (Sigma-Aldrich, Seelze, Alemanha)

#### 5.1.1.3 – Preparação das Amostras

As soluções dos analitos foram preparadas em ACN (acetonitrilo) (Fluka, Seelze, Alemanha) de grau de pureza LC-MS a uma concentração de  $10\mu\text{M}$  e acidificadas com 1% de ácido fórmico (Fluka), de grau LC-MS.

Na preparação das amostras dos compostos **40** e **42**, foi também utilizado o metanol deuterado Metanol- $d_1$  ( $\text{CH}_3\text{OD}$ ) (Sigma-Aldrich, Seelze, Alemanha) para se obter o íon  $[\text{M}+\text{D}]^+$ .

### 5.1.2 – Avaliação da Estabilidade Metabólica

#### 5.1.2.1 – Equipamento

##### 5.1.2.1.1 - Determinação do Comprimento de Onda de Máxima Absorção por Espectrofotometria de UV/VIS

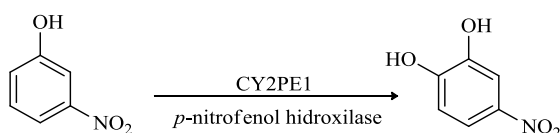
Com o objetivo de estabelecer as condições ideais para a realização dos estudos de estabilidade, foi determinado o comprimento de onda de máxima absorção ( $\lambda_{\text{max}}$ ) dos compostos a analisar, num espectrofotômetro Shimadzu UV-2100PC, UV/VIS de feixe duplo, acoplado a um sistema de aquecimento termostatzado da Shimadzu CPS-260. O valor de máxima absorção dos compostos foi determinado por varrimento dos comprimentos de onda numa faixa entre os 200 e 400nm. A concentração das soluções foi de  $10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$ , obtida por diluição de uma solução estoque de  $1 \times 10^{-2} \text{ mol.dm}^{-3}$  em

ACN (Acetonitrile - Sigma *Lichrosly* por HPLC - EUA).

O comprimento de onda de máxima absorção obtido para todos os compostos e utilizado em todos os ensaios foi de 250nm.

#### 5.1.2.1.2 - Determinação da Atividade Enzimática por Espectrofotometria de UV/VIS

A certificação da atividade enzimática dos microsomas, declarada pelo fabricante foi efetuada através da medição da atividade da enzima CYP2E1. Para tal, foram efetuados estudos espectrofotométricos, utilizando o equipamento descrito em 5.1.2.1.1. Estes estudos permitiram quantificar a enzima hidroxilase responsável pela transformação do *p*-nitrofenol a *p*-nitrocatecol (esquema 22)



**Esquema 25 - Reação enzimática de transformação do *p*-nitrofenol a *p*-nitrocatecol, mediada pelo CYP2E1**

#### 5.1.2.1.3 – Determinação da Estabilidade em Tampão Fosfato por HPLC-UV/VIS

O estudo da estabilidade dos compostos **40-51** foi efetuado recorrendo a um método descontínuo em que várias alíquotas da mistura reacional foram analisadas ao longo do tempo num cromatógrafo líquido de alta resolução (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*) ELITE LaChrom VWR HITACHI com uma bomba Merck Hitachi L-7100, um injetor Rheodyne de 20µl, um registador Chromato-Integrator Merck-Hitachi D2500A e uma coluna, de fase reversa, Lichrocart®, RP-18e, (250×4 mm) com partículas de 5µm, acoplado a um detector espectrofotométrico UV-VIS Shimadzu SPD-6AV, de comprimento de onda variável.

A fase móvel consistiu em ACN/H<sub>2</sub>O (acetonitrilo/água), à qual foi adicionado o tampão fosfato (pH=3,11) de modo a se obter uma solução final contendo 5% de tampão. Dependendo do composto injetado, o eluente variava de proporções entre a fase aquosa e a fase orgânica (ver dados em 2.2.1.1, tabela 1).

Todas as análises foram realizadas no modo isocrático a fluxo constante de

1ml/min e no comprimento de onda de 250nm, escolhido pela determinação da absorvência máxima por espectroscopia de UV-Visível numa faixa entre os 200 e 400nm.

#### **5.1.2.1.4 – Determinação da Estabilidade Metabólica em Microsomas de Fígado de Rato por HPLC-UV/VIS**

Para a determinação da estabilidade metabólica, foi utilizado o cromatógrafo líquido-líquido de alta resolução (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*) ELITE LaChrom VWR HITACHI, descrito em 5.1.2.1.4 e que operou sob as mesmas condições

A otimização das condições cromatográficas com vista à separação de picos correspondentes aos compostos, com uma resolução adequada e tempos de análise reduzidos, foi obtida por variação da composição da fase móvel e do pH da solução tampão, adicionada com a finalidade de estabilizar os compostos em solução (ver dados em 2.2.1.1, tabela 3).

#### **5.1.2.1.5 - Outros Equipamentos**

Para além dos equipamentos acima descritos, foram também, usados, durante os ensaios:

- Uma centrífuga SIGMA (112 - 4000×g) (13000 rpm),
- Um vortex Genie™, Modelo K-550-GE, Scientific Industries, Inc; Rx<sup>3</sup> VelpScientifica)
- Um banho Julabo MP com refrigerante Julabo F12 incorporado, para termostatar as soluções reacionais.
- Um potenciómetro micro pH 2002 Crison, para a leitura do pH das soluções de tampão fosfato
- Um banho ultrassónico, para desgaseificação dos solventes para HPLC

### 5.1.2.2 – Material, Reagentes e Solventes

#### 5.1.2.2.1 - Material

O material específico utilizado na aplicação desta metodologia consistiu em:

- Micropipetas de 10, 100, 1000  $\mu$ L VWR International
- Cuvetas de quartzo para UV/VIS
- Vials de 1,5 mL, VWR International
- Seringas de 50  $\mu$ L Agilent Technologie
- *Eppendorf* de 1000  $\mu$ L

#### 5.1.2.2.2 – Reagentes e Solventes

- ACN (acetonitrilo) (Sigma *Lichrosolv* por HPLC – UV/VIS - EUA).
- Ácido fórmico (Fluka), de grau LC-MS.
- Pastilhas de PBS (tampão fostato) Sigma-Aldrich Seelze, Alemanha
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck.) de grau analítico
- $\text{H}_3\text{PO}_4$  (Alfa Aesar) de grau analítico
- Água desionizada, obtida através da passagem da água bidestilada numa resina de troca iônica Millipore-Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA), tendo sido recolhida com uma resistividade de  $18 \text{ m}\Omega \text{ cm}^{-1}$
- Ácido tricloroacético (TCA) de grau analítico
- Hidróxido de sódio (Sigma-Aldrich) de grau analítico
- p-Nitrofenol (Merck) de grau analítico
- Microsomas (20mg/ml de conteúdo proteico), extraídos de ratos machos Sprague-Dawley, (BD Gentest™, Discovery Labware Inc., Woburn, MA). (Enzifarma) e conservados a  $-80^\circ\text{C}$
- Soluções regeneradoras de sistema NADPH A (31mM  $\text{NADP}^+$ , 66mM glucose-6-fosfato e 66mM  $\text{MgCl}_2$ ) e B (40 U/ml glucose-6-fosfato desidrogenase em 5mM citrato de sódio) (BD Gentest™, Discovery Labware Inc., Woburn, MA). (Enzifarma). Estas soluções foram mantidas a  $-20^\circ\text{C}$ .

### 5.1.2.2.3 – Preparação de Soluções

A solução de PBS (pH 7,4, 0,01M) foi preparada por dissolução de uma pastilha de **tampão** fosfato (Sigma-Aldrich) em 200 ml de água desionizada.

O tampão fosfato (pH 3,11) usado nos ensaios de HPLC foi preparado a partir de 980 ml de uma solução de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1M (preparada por dissolução de 136g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  em 1000 ml de água desmineralizada) e  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , em quantidade suficiente para perfazer num volume total de 1000ml de solução.

### 5.1.2.3 – Preparação das amostras

#### 5.1.2.3.1 - Otimização das Condições Analíticas por Espectrofotometria de UV/VIS e por HPLC-UV/VIS

A concentração das soluções foi de  $10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$ , obtida por diluição de uma solução padrão de  $1 \times 10^{-2} \text{ mol.dm}^{-3}$  em ACN (Acetonitrile - Sigma *Lichrosolv* por HPLC – UV/VIS - EUA).

Estas soluções foram usadas como padrões que possibilitaram a correta identificação de cada um dos compostos por espectrofotometria de UV/VIS, a avaliação dos eluentes mais adequados e a determinação dos tempos de eluição para a análise cromatográfica por HPLC-UV/VIS.

#### 5.1.2.3.2 – Confirmação da Atividade Enzimática por Espectrofotometria de Massa UV/VIS

O procedimento consistiu na adição sucessiva de 20 $\mu$ l de uma solução 5mM de p-nitrofenol, 50 $\mu$ l da solução A, (31 mM NADP<sup>+</sup>, 66 mM glucose-6-fosfato e 66 mM  $\text{MgCl}_2$ ) e 10 $\mu$ l da solução B (40 U/ml glucose fosfato desidrogenase em 5 mM citrato de sódio), regeneradoras de sistema NADPH, à 880 $\mu$ l de 5,0 mM de tampão fosfato de potássio (PBS - *Phosphate Buffer Solution*) pH 7,4. Após a estabilização da solução, no banho a 37°C, durante 5 minutos, foram adicionados 40 $\mu$ l de uma mistura contendo 20 $\mu$ l de microssomas e 60 $\mu$ l de tampão fosfato de potássio. A mistura reacional foi incubada a 37°C durante 30 minutos. Após este tempo foram adicionados 200 $\mu$ l de

ácido tricloroacético (TCA) a 20% (v/v) e para parar a reação enzimática, a mistura reacional foi colocada no gelo durante 5min. Procedeu-se de seguida a centrifugação da solução a 10.000 rpm, durante 5 minutos. 1,0ml do sobrenadante foi transferido para um *eppendorf* contendo 500µl de NaOH 2M e procedeu-se a homogeneização da solução no vórtex.

Como branco foi utilizada uma mistura incubada, em que o volume dos microsomas foi substituído por tampão fosfato.

#### 5.1.2.3.3 - Avaliação da Estabilidade em Tampão Fosfato

As soluções dos analitos foram preparadas a partir 5 ml de tampão fosfato isotónico (pH 7,4, 0,01M) que foram transferidos para um frasco de reação, “*falcon*” num banho de água previamente termostatizado a 37°C. Após a estabilização da temperatura, adicionou-se 5 µl da solução padrão  $10^{-2}$  mol dm<sup>-3</sup> do substrato em ACN, obtendo-se assim uma concentração final de  $10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>. Para a análise dos compostos **40-51** as alíquotas foram retiradas ao longo do tempo, durante 3 dias. 20 µl foram injetados no HPLC.

#### 5.1.2.3.4 - Avaliação da Estabilidade nos Microsomas de Fígado de Rato

Num *eppendorf* contendo 10 µl de homogenato de fígado de rato (0,2mg de proteína/ml, BD Gentest, Discovery Labware Inc., Woburn, MA) foram adicionados 920µl da solução de tampão fosfato (PBS - *Phosphate Buffer Solution*) (10mM, pH 7.4 a 25°C), 50µl da solução A (31 mM NADP<sup>+</sup>, 66 mM glucose-6-fosfato e 66 mM MgCl<sub>2</sub>) e 10µl da solução B (40 U/ml glucose-6-fosfato desidrogenase em 5 mM citrato de sódio). Para estabilizar, esta mistura foi inicialmente mantida num banho de água circulante termostatizado a 37°C, durante 5 min. A reação metabólica teve início após a adição de 10µl do substrato  $10^{-2}$  mol dm<sup>-3</sup>, de modo a se obter uma concentração final de  $10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>. Imediatamente, antes de iniciar a incubação, foram transferidos 50µl da mistura reacional para um *eppendorf* contendo 450µl de acetonitrilo para terminar a reação por precipitação das proteínas. A mistura resultante foi homogeneizada em vórtex e posteriormente centrifugada a 10.000 rpm (rotações por minuto) durante 10 minutos. Esta amostra, foi referenciada como mistura reacional no tempo zero (t<sub>0</sub>). Este procedimento foi repetido a determinados intervalos de tempos, até um máximo de 24

horas de incubação. 20µl da fração do sobrenadante foram injetados e analisados por HPLC.

### **5.1.3 – Detecção e Identificação de Metabolitos**

#### **5.1.3.1 - Equipamento**

A avaliação dos compostos e seus metabolitos por LC-MS/MS foi efetuada, num cromatógrafo líquido da Alliance (Waters 2695 Separation Module), acoplado ao espectrômetro de massa do tipo triplo quadrupolo (Micromass Quattro Micro API). As amostras foram analisadas usando uma coluna de fase reversa (DC-18, 150 x 2,1 mm, 5 µm; Atlantis®) e uma pré-coluna com a mesma fase estacionária operando a 35°C. As amostras foram analisadas utilizando como eluente A (água acidificada com ácido fórmico a 0,5%) e como eluente B (acetonitrilo), a um fluxo de 0,30 mL/min.

A detecção foi efetuada usando um detector de foto-díodos no intervalo de comprimento de onda de absorção ( $\lambda$ ) de 210 a 600nm. As condições MS foram estabelecidas no modo ESI positivo. A temperatura da fonte foi de 120°C, a de dessolvatação foi de 350°C. Os fluxos de gás do cone e o de gás de dessolvatação foram 50 e 750L/h, respetivamente. o potencial do capilar foi ajustado para 2,5kV, o do cone de amostragem para 10V, e o do extrator para 1V. A aquisição e o processamento de dados foram realizados utilizando o *software* MassLynx (Waters), versão 4.0

##### **5.1.3.1.1 – Otimização das Condições Analíticas por LC-MS/MS**

###### **5.1.3.1.1.1 - No HPLC**

Após a otimização das melhores condições de separação cromatográfica, as condições do gradiente de eluição aplicadas para os compostos **40**, **41** e **44** para a detecção de metabolitos resultantes da N-desalquilação consistiram em 25% de eluente B durante 5 min; tendo sido depois aplicado um gradiente linear até 99% de B num período de 5 min. O sistema foi reequilibrado com 25% de eluente B durante 6 min. O volume de injeção foi de 5 µl.



Para a detecção de outros metabolitos o tempo de análise foi alterado de 16 para 30 min e consistiu em 25% de eluente B durante 20 min; tendo sido depois aplicado um gradiente linear até 99% de B num período de 5 min. O sistema foi reequilibrado com 25% de eluente B durante 5 min. O volume de injeção foi de 5 µl.

Para o composto **44** as condições foram de 10% de eluente B durante 10 min, seguido de um gradiente linear até 90% de B durante 1 min. O sistema foi reequilibrado com 90% de eluente A durante 9 min. O volume de injeção foi de 20µl.

#### **5.1.3.1.1.2 – No Espectrómetro de Massa QQQ**

As experiências no analisador foram realizadas utilizando Árgon (Ar) (Gasin, Leça da Palmeira, Portugal) de pureza ultra elevada, como gás de colisão a uma pressão de cerca  $3 \times 10^{-3}$  mbar. A fragmentação foi induzida, por aplicação de energias de colisão (EC) entre os 0 e 45eV.

Embora o objetivo deste trabalho não fosse quantificar os compostos, por inexperiência a pesquisa dos metabolitos, resultantes da *N*-desalquilação, nos compostos **40** e **41** foi efetuada com base no modo de operação MRM, que possibilitou a escolha de 2 transições (ião precursor e ião produto), após a otimização da energia de colisão necessária para a fragmentação dos iões precursores.

#### **5.1.3.2 - Material e Reagentes**

Para esta avaliação, foram usados os materiais e os reagentes descritos em 5.1.2.2

#### **5.1.3.3 – Preparação das Amostras**

As soluções dos compostos, usadas para a pesquisa de metabolitos, foram as misturas de incubação em microssomas, nos tempos  $t_{0h}$ ,  $t_{6h}$  e  $t_{24h}$ , preparadas pelo procedimento descrito para a avaliação da estabilidade nos microssomas de fígado de rato (5.1.2.3).

## **5.2 – Procedimento Experimental para a Avaliações dos Derivados Endoperóxidos Tetraoxanos**

Para a avaliação dos derivados endoperóxidos tetraoxanos foram, de um modo geral, usados os mesmos equipamentos, procedimentos, material e reagentes previamente descritos para as quinolon-4(*1H*)-iminas. Assim serão somente referidas as diferenças introduzidas em função da natureza dos compostos.

### **5.2.1 – Identificação e Caracterização dos Compostos**

O comportamento destes compostos no analisador foi somente avaliado no equipamento do tipo QQQ, descrito em 5.1.1

### **5.2.2 – Avaliação da Estabilidade Metabólica por HPLC**

#### **5.2.2.1 – Equipamento**

Os ensaios foram efetuados no cromatógrafo líquido da Alliance (Waters 2695 Separation Module), descrito em 5.1.3.1 acoplado ao espectro de massa. As amostras foram analisadas usando uma coluna de fase reversa (C-18, 100x2.1 mm; 5  $\mu$ m; Sunfire<sup>TM</sup>) e como eluente A (água acidificada com ácido fórmico a 0,5%) e como eluente B (acetonitrilo), na proporção de 80:20 (ACN:H<sub>2</sub>O +0,5% HCOOH) a um fluxo isocrático de 0,30mL/min, durante 15 min. O comprimento de onda de máxima absorção obtido para todos os compostos e utilizado em todos os ensaios foi de 265nm, escolhido em função do valor de máxima absorção.

#### **5.2.2.2 – Preparação das Amostras**

Para a realização deste ensaio, foram usadas concentrações finais de substrato de 10 $\mu$ M, uma vez que, alguns estudos efetuados, indicam a probabilidade de ocorrência

da inibição do sistema microsomal, pela cadeia endoperoxídica, a concentrações elevadas de substrato.

Assim, a preparação das amostras, neste ensaio, consistiu na adição sequencial de 570µl de água desionizada, 160µl de tampão fosfato (50 mM pH 7,4) e 8,0 µl de substrato na concentração de  $10^{-3}$  mol.dm<sup>-3</sup> (1mM), num *eppendorf* contendo 20µl de concentrado de homogenato.

A mistura foi mantida cerca de 5min no banho a 37°C para uma breve estabilização da temperatura. A reação teve início após a adição das soluções regeneradoras de NADPH constituídas por 40µl da solução A (26mM NADP<sup>+</sup>; 66mM 6-fosfato-D-glucose; 66mM de cloreto de magnésio) e de 8µl de solução B (6-fosfato de glucose desidrogenase (40 U/ml) em 5mM de citrato de sódio). Imediatamente, antes de iniciar a incubação, foram pipetados 100µl da mistura reacional para um *eppendorf* contendo 100µl de ACN. Esta alíquota foi referenciada como  $t_{0h}$ . Durante o decorrer da reação alíquotas subsequentes foram sendo retiradas, durante 2 horas, em intervalos de tempos de 15min até a primeira hora e depois em intervalos de 30min até a segunda hora. A reação foi sempre dada por terminada após a adição de ACN. Após a homogeneização no vortex, a mistura foi centrifugada durante 10 minutos, a 10.000rpm. O sobrenadante contendo uma concentração de  $10^{-6}$  mol.dm<sup>-3</sup> de substrato foi coletado para análise cromatográfica por HPLC

## 5.2.3 – Detecção e Identificação de Metabolitos

### 5.2.3.1 – Equipamento

Os ensaios foram efetuados no equipamento, descrito em 5.1.3.1. Como eluente A foi usada água acidificada com ácido fórmico a 0,5% e como eluente B (acetonitrilo) a um fluxo de 0,30 mL/min.

As condições do gradiente de eluição aplicadas para o composto **52** e para os tetraoxanos **53-55** consistiram em 1% de eluente B durante 20 min, tendo sido depois aplicado um gradiente linear até 99% de de eluente B num período de 5 min. O sistema foi reequilibrado com 1% de eluente B durante 10 min. O volume de injeção foi de 20 µl.

### **5.2.3.2 – Preparação das Amostras**

As soluções dos compostos, usadas para a pesquisa de metabolitos, foram as misturas de incubação em microssomas, nos tempos  $t_{0h}$ ,  $t_{1h}$  e  $t_{2h}$ , preparadas pelo procedimento descrito para a avaliação da estabilidade nos microssomas de fígado de rato (5.2.2.2).

# Referências Bibliográficas

---



## 6 - Referências Bibliográficas

1. W.H.O, *World malaria report 2013.* , Geneva 2014.
2. W.H.O, *Malaria entomology and vector control*, 2013.
3. Hay, S.I., C.A. Guerra, A.J. Tatem, A.M. Noor, and R.W. Snow, *The global distribution and population at risk of malaria: Past, present, and future.* The Lancet Infectious Diseases, 2004. **4**(6): p. 327-336.
4. Greenwood, B.M., K. Bojang, C.J.M. Whitty, and G.a.T. Targett, *Malaria.* The Lancet. **365**(9469): p. 1487-1498.
5. Cox-Singh, J. and B. Singh, *Knowlesi malaria: Newly emergent and of public health importance?* Trends in Parasitology, 2008. **24**(9): p. 406-410.
6. Petersen, I., R. Eastman, and M. Lanzer, *Drug-resistant malaria: Molecular mechanisms and implications for public health.* FEBS Letters, 2011. **585**(11): p. 1551-1562.
7. Breman, J.G. and A.D. Brandling-Bennett, *The challenge of malaria eradication in the twenty-first century: Research linked to operations is the key.* Vaccine, 2011. **29**, **Supplement 4**(0): p. D97-D103.
8. Alonso, P.L. and M. Tanner, *Public health challenges and prospects for malaria control and elimination.* Nature medicine, 2013. **19**(2): p. 150-155.
9. Craig, A.G., G.E. Grau, C. Janse, J.W. Kazura, D. Milner, J.W. Barnwell, et al. J. Langhorne, *The role of animal models for research on severe malaria.* PLoS Pathog, 2012. **8**(2): p. e1002401-e1002401.
10. Renia, L., S.W. Howland, C. Claser, A.C. Gruner, R. Suwanarusk, T.-H. Teo, et al. L.F.P. Ng, *Cerebral malaria mysteries at the blood-brain barrier.* Virulence, 2012. **3**(2): p. 193-201.
11. W.H.O, *Fact sheet# n94 malaria.* Health Communications and Public Relations, Geneva, 1996.
12. White, N.J., *Antimalarial drug resistance.* The Journal of clinical investigation, 2004. **113**(8): p. 1084-1092.
13. Wirth, D.F., *The parasite genome: Biological revelations.* Nature, 2002. **419**(6906): p. 495-496.
14. Biamonte, M.A., J. Wanner, and K.G. Le Roch, *Recent advances in malaria*

- drug discovery*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2013. **23**(10): p. 2829-2843.
15. Winzeler, E.A., *Malaria research in the post-genomic era*. Nature, 2008. **455**(7214): p. 751-756.
  16. Vangapandu, S., M. Jain, K. Kaur, P. Patil, S.R. Patel, and R. Jain, *Recent advances in antimalarial drug development*. Medicinal Research Reviews, 2007. **27**(1): p. 65-107.
  17. Wellems, T.E. and C.V. Plowe, *Chloroquine-resistant malaria*. Journal of Infectious Diseases, 2001. **184**(6): p. 770-776.
  18. Rosenthal, P.J., *Proteases of malaria parasites: New targets for chemotherapy*. Emerging Infectious Diseases, 1998. **4**(1): p. 49-57.
  19. Sahu, N.K., S. Sahu, and D.V. Kohli, *Novel molecular targets for antimalarial drug development*. Chemical Biology & Drug Design, 2008. **71**(4): p. 287-297.
  20. Olliaro, P.L. and Y. Yuthavong, *An overview of chemotherapeutic targets for antimalarial drug discovery*. Pharmacology & Therapeutics, 1999. **81**(2): p. 91-110.
  21. Rodrigues, T., M. Prudencio, R. Moreira, M.M. Mota, and F. Lopes, *Targeting the liver stage of malaria parasites: A yet unmet goal*. J Med Chem, 2012. **55**(3): p. 995-1012.
  22. Burrows, J.N., *Antimalarial drug discovery: Where next?* Future Medicinal Chemistry, 2012. **4**(18): p. 2233-2235.
  23. Tilley, L., P. Loria, and M. Foley, *Antimalarial chemotherapy: Mechanisms of action, resistance and new directions in drug discovery*, edited by pj rosenthal, 2001, New Jersey: Humana Press.
  24. Srivastava, I.K. and A.B. Vaidya, *A mechanism for the synergistic antimalarial action of atovaquone and proguanil*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1999. **43**(6): p. 1334-1339.
  25. Srivastava, I.K., J.M. Morrissey, E. Darrouzet, F. Daldal, and A.B. Vaidya, *Resistance mutations reveal the atovaquone-binding domain of cytochrome b in malaria parasites*. Molecular Microbiology, 1999. **33**(4): p. 704-711.
  26. Nixon, G.L., C. Pidathala, A.E. Shone, T. Antoine, N. Fisher, P.M. O'Neill, et al. G.A. Biagini, *Targeting the mitochondrial electron transport chain of plasmodium falciparum: New strategies towards the development of improved*



- antimalarials for the elimination era*. Future Medicinal Chemistry, 2013. **5**(13): p. 1573-1591.
27. Schlitzer, M., *Antimalarial drugs – what is in use and what is in the pipeline*. Archiv der Pharmazie, 2008. **341**(3): p. 149-163.
28. Dondorp, A.M., S. Yeung, L. White, C. Nguon, N.P.J. Day, D. Socheat, and L. Von Seidlein, *Artemisinin resistance: Current status and scenarios for containment*. Nat Rev Micro, 2010. **8**(4): p. 272-280.
29. Sa, J.M., J.L. Chong, and T.E. Wellems, *Malaria drug resistance: New observations and developments*. Essays in biochemistry, 2011. **51**: p. 137-160.
30. Awofeso, N., *Project 523: Transformation of artemisinin from traditional chinese medicine to mainstream anti-malaria chemotherapy*. Spatula DD, 2011. **1**(2): p. 113-118.
31. Krishna, S., A.-C. Uhlemann, and R.K. Haynes, *Artemisinins: Mechanisms of action and potential for resistance*. Drug Resistance Updates, 2004. **7**(4–5): p. 233-244.
32. Meshnick, S.R., *Artemisinin: Mechanisms of action, resistance and toxicity*. International Journal for Parasitology, 2002. **32**(13): p. 1655-1660.
33. Muregi, F.W. and A. Ishih, *Next-generation antimalarial drugs: Hybrid molecules as a new strategy in drug design*. Drug Development Research, 2010. **71**(1): p. 20-32.
34. Capela, R., G.G. Cabal, P.J. Rosenthal, J. Gut, M.M. Mota, R. Moreira, et al. M. Prudencio, *Design and evaluation of primaquine-artemisinin hybrids as a multistage antimalarial strategy*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2011. **55**(10): p. 4698-4706.
35. Meunier, B., *Hybrid molecules with a dual mode of action: Dream or reality?* Accounts of Chemical Research, 2007. **41**(1): p. 69-77.
36. Rosenthal, P.J., *Antimalarial drug discovery: Old and new approaches*. Journal of Experimental Biology, 2003. **206**(21): p. 3735-3744.
37. Miranda, D., R. Capela, I.S.S. Albuquerque, P. Meireles, I. Paiva, F.T. Nogueira, et al. R. Oliveira, *Novel endoperoxide-based transmission-blocking antimalarials with liver-and blood-schizontocidal activities*. ACS Medicinal Chemistry Letters, 2013. **5**(2): p. 108-112.
38. Kaur, K., M. Jain, R.P. Reddy, and R. Jain, *Quinolines and structurally related*

- heterocycles as antimalarials*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2010. **45**(8): p. 3245-3264.
39. Sweeney, A.W., C.R.B. Blackburn, and K.H. Rieckmann, *Short report: The activity of pamaquine, an 8-aminoquinoline drug, against sporozoite-induced infections of plasmodium vivax (new guinea strains)*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 2004. **71**(2): p. 187-189.
40. Grewal, R.S., *Pharmacology of 8-aminoquinolines*. Bulletin of the World Health Organization, 1981. **59**(3): p. 397-406.
41. Vale, N., R. Moreira, and P. Gomes, *Primaquine revisited six decades after its discovery*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2009. **44**(3): p. 937-953.
42. Mcchesney, J.D., *Considerations about the structure-activity-relationships of 8-aminoquinoline anti-malarial drugs*. Bulletin of the World Health Organization, 1981. **59**(3): p. 459-462.
43. Foley, M. and L. Tilley, *Quinoline antimalarials: Mechanisms of action and resistance*. International Journal for Parasitology, 1997. **27**(2): p. 231-240.
44. Baird, J.K. and S.L. Hoffman, *Primaquine therapy for malaria*. Clinical Infectious Diseases, 2004. **39**(9): p. 1336-1345.
45. Baird, J.K. and C. Surjadja, *Consideration of ethics in primaquine therapy against malaria transmission*. Trends in Parasitology, 2011. **27**(1): p. 11-16.
46. Vale, N., F. Nogueira, V.E. Do Rosário, P. Gomes, and R. Moreira, *Primaquine dipeptide derivatives bearing an imidazolidin-4-one moiety at the n-terminus as potential antimalarial prodrugs*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2009. **44**(6): p. 2506-2516.
47. O'Neill, P.M., P.G. Bray, S.R. Hawley, S.A. Ward, and B.K. Park, *4-aminoquinolines—past, present, and future; a chemical perspective*. Pharmacology & Therapeutics, 1998. **77**(1): p. 29-58.
48. Vennerstrom, J.L., E.O. Nuzum, R.E. Miller, A. Dorn, L. Gerena, P.A. Dande, et al. W.K. Milhous, *8-aminoquinolines active against blood stage plasmodium falciparum in vitro inhibit hematin polymerization*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1999. **43**(3): p. 598-602.
49. Schmidt, L., *Relationships between chemical structures of 8-aminoquinolines and their capacities for radical cure of infections with plasmodium cynomolgi in rhesus monkeys*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1983. **24**(5): p. 615-

- 652.
50. Goodwin, T.E., C.J. Boylan, W.L. Current, J.C. Byrd, C.B. Edwards, D.A. Fuller, et al. W.A. Tucker, *Enhanced pneumocystis carinii activity of new primaquine analogues*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2000. **10**(19): p. 2205-2208.
51. Marcsisin, S.R., J.C. Sousa, G.A. Reichard, D. Caridha, Q. Zeng, N. Roncal, et al. J.W. Bennett, *Tafenoquine and npc-1161b require cyp 2d metabolism for anti-malarial activity: Implications for the 8-aminoquinoline class of anti-malarial compounds*. Malar J, 2014. **13**(2): p. 10.1186.
52. Krudsood, S., P. Wilairatana, N. Tangpukdee, K. Chalermrut, S. Srivilairit, V. Thanachartwet, et al. S. Looareesuwan, *Safety and tolerability of elubiquine (bulaquine, cdri 80/53) for treatment of plasmodium vivax malaria in thailand*. The Korean journal of parasitology, 2006. **44**(3): p. 221-228.
53. Woodrow, C.J., R.K. Haynes, and S. Krishna, *Artemisinins*. Postgraduate Medical Journal, 2005. **81**(952): p. 71-78.
54. Chaturvedi, D., A. Goswami, P. Pratim Saikia, N.C. Barua, and P.G. Rao, *Artemisinin and its derivatives: A novel class of anti-malarial and anti-cancer agents*. Chemical Society Reviews, 2010. **39**(2): p. 435-454.
55. Coslédan, F., L. Fraisse, A. Pellet, F. Guillou, B. Mordmüller, P.G. Kremsner, et al. B. Meunier, *Selection of a trioxaquine as an antimalarial drug candidate*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**(45): p. 17579-17584.
56. Borstnik, K., I.-H. Paik, T.A. Shapiro, and G.H. Posner, *Antimalarial chemotherapeutic peroxides: Artemisinin, yingzhaosu and related compounds*. International Journal for Parasitology, 2002. **32**(13): p. 1661-1667.
57. Dong, Y., K.J. McCullough, S. Wittlin, J. Chollet, and J.L. Vennerstrom, *The structure and antimalarial activity of dispiro-1,2,4,5-tetraoxanes derived from (+)-dihydrocarvone*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2010. **20**(22): p. 6359-6361.
58. O'Neill, P.M., R.K. Amewu, G.L. Nixon, F. Bousejra Elgarah, M. Mungthin, J. Chadwick, et al. S.A. Ward, *Identification of a 1,2,4,5-tetraoxane antimalarial drug-development candidate (rka 182) with superior properties to the semisynthetic artemisinins*. Angewandte Chemie International Edition, 2010.

- 49(33): p. 5693-5697.
59. De Ridder, S., F. Van Der Kooy, and R. Verpoorte, *Artemisia annua as a self-reliant treatment for malaria in developing countries*. Journal of Ethnopharmacology, 2008. **120**(3): p. 302-314.
60. Meshnick, S.R., T. Taylor, and S. Kamchonwongpaisan, *Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: From herbal remedy to targeted chemotherapy*. Microbiological reviews, 1996. **60**(2): p. 301-315.
61. Biagini, G.A., N. Fisher, A.E. Shone, M.A. Mubarak, A. Srivastava, A. Hill, et al. C. Pidathala, *Generation of quinolone antimalarials targeting the plasmodium falciparum mitochondrial respiratory chain for the treatment and prophylaxis of malaria*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(21): p. 8298-8303.
62. Bueno, J.M., P. Manzano, M.C. García, J. Chicharro, M. Puente, M. Lorenzo, et al. D. Gargallo-Viola, *Potent antimalarial 4-pyridones with improved physico-chemical properties*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2011. **21**(18): p. 5214-5218.
63. Jayaraman, V., V. Bulusu, and H. Balaram, *Crosstalk between purine nucleotide metabolism and mitochondrial pathways in plasmodium falciparum*. Current Science (Bangalore), 2012. **102**(5): p. 757-766.
64. Almela, M.J., P.A. Torres, S. Lozano, and E. Herreros, *Characterization of the phospholipidogenic potential of 4(1h)-pyridone antimalarial derivatives*. Toxicology in Vitro, 2009. **23**(8): p. 1528-1534.
65. Rodrigues, T., R. Moreira, J. Gut, P.J. Rosenthal, P.M. O'Neill, G.A. Biagini, et al. R.C. Guedes, *Identification of new antimalarial leads by use of virtual screening against cytochrome bc1*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2011. **19**(21): p. 6302-6308.
66. Rodrigues, T., R.C. Guedes, D.J.V.A. Dos Santos, M. Carrasco, J. Gut, P.J. Rosenthal, et al. F. Lopes, *Design, synthesis and structure-activity relationships of (1h-pyridin-4-ylidene)amines as potential antimalarials*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2009. **19**(13): p. 3476-3480.
67. Yeates, C.L., J.F. Batchelor, E.C. Capon, N.J. Cheesman, M. Fry, A.T. Hudson, et al. J.M. Bueno, *Synthesis and structure-activity relationships of 4-pyridones as potential antimalarials*. Journal of Medicinal Chemistry, 2008. **51**(9): p.

- 2845-2852.
68. Rodrigues, T., F.P. Da Cruz, M.J. Lafuente-Monasterio, D. Gonçalves, A.S. Ressurreição, A.R. Siteo, et al. R. Moreira, *Quinolin-4(1h)-imines are potent antiplasmodial drugs targeting the liver stage of malaria*. Journal of Medicinal Chemistry, 2013. **56**(11): p. 4811-4815.
69. Dass, C., *Basics of mass spectrometry*, in *Fundamentals of contemporary mass spectrometry* 2006, John Wiley & Sons, Inc. p. 1-14.
70. Gross, J.H. and P. Roepstorff, *Mass spectrometry: A textbook* 2011: Springer.
71. Siteo, A.R., F. Lopes, R. Moreira, A. Coelho, and M.R. Bronze, *Contribution of mass spectrometry to the study of antimalarial agents*. Tandem mass spectrometry-molecular characterization": Coelho, av (ed.) intech, rijeka 2013.
72. Lanças, F.M., *A cromatografia líquida moderna ea espectrometria de massas: Finalmente "compatíveis"*. Scientia chromatographica, 2009. **1**(2): p. 35-61.
73. Vestal, M.L., *Methods of ion generation*. Chemical reviews, 2001. **101**(2): p. 361-376.
74. Konermann, L., E. Ahadi, A.D. Rodriguez, and S. Vahidi, *Unraveling the mechanism of electrospray ionization*. Analytical Chemistry, 2012. **85**(1): p. 2-9.
75. Kebarle, P. and U.H. Verkerk, *Electrospray: From ions in solution to ions in the gas phase, what we know now*. Mass Spectrometry Reviews, 2009. **28**(6): p. 898-917.
76. Carlton Jr, D.D. and K.A. Schug, *A review on the interrogation of peptide-metal interactions using electrospray ionization-mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, 2011. **686**(1-2): p. 19-39.
77. Cech, N.B. and C.G. Enke, *Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals*. Mass Spectrometry Reviews, 2001. **20**(6): p. 362-387.
78. Bruins, A.P., *Mechanistic aspects of electrospray ionization*. Journal of Chromatography A, 1998. **794**(1-2): p. 345-357.
79. Veenstra, T.D., *Electrospray ionization mass spectrometry in the study of biomolecular non-covalent interactions*. Biophysical Chemistry, 1999. **79**(2): p. 63-79.
80. Taylor, G. *Disintegration of water drops in an electric field*. in *Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering*

- Sciences*. 1964. The Royal Society.
81. Fernández De La Mora, J., *The fluid dynamics of taylor cones*. Annual Review of Fluid Mechanics, 2007. **39**(1): p. 217-243.
  82. Gomez, A. and K.Q. Tang, *Charge and fission of droplets in electrostatic sprays*. Physics of Fluids, 1994. **6**(1): p. 404-414.
  83. Hirabayashi, A., *Evaporation of charged fine droplets*. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, 1998. **175**(3): p. 241-245.
  84. Cole, R.B., *Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry*. Journal of Mass Spectrometry, 2000. **35**(7): p. 763-772.
  85. Iavarone, A.T. and E.R. Williams, *Mechanism of charging and supercharging molecules in electrospray ionization*. Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**(8): p. 2319-2327.
  86. Fenn, J.B., *Ion formation from charged droplets: Roles of geometry, energy, and time*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 1993. **4**(7): p. 524-535.
  87. Nguyen, S. and J.B. Fenn, *Gas-phase ions of solute species from charged droplets of solutions*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(4): p. 1111-1117.
  88. De Hoffmann, E. and V. Stroobant, *Mass spectrometry: Principles and applications*. 2007. John Wiley. **8**.
  89. Sleno, L. and D.A. Volmer, *Ion activation methods for tandem mass spectrometry*. Journal of Mass Spectrometry, 2004. **39**(10): p. 1091-1112.
  90. Palit, M. and G. Mallard, *Fragmentation energy index for universalization of fragmentation energy in ion trap mass spectrometers for the analysis of chemical weapon convention related chemicals by atmospheric pressure ionization-tandem mass spectrometry analysis*. Analytical Chemistry, 2009. **81**(7): p. 2477-2485.
  91. De Hoffmann, E., *Tandem mass spectrometry: A primer*. Journal of Mass Spectrometry, 1996. **31**(2): p. 129-137.
  92. Hoffmann, E. and V. Stroobant, *Mass spectrometry: Principles and applications* 2007. Ludwig Institute for Cancer Research, Brussels, Belgium.
  93. McLuckey, S.A., *Principles of collisional activation in analytical mass spectrometry*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 1992.

- 3(6): p. 599-614.
94. Madeira, P.J.A. and M.H. Florêncio, *Applications of tandem mass spectrometry: From structural analysis to fundamental studies*, 2012, InTech.
95. Griffiths, W., A. Jonsson, S. Liu, D. Rai, and Y. Wang, *Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry*. Biochem. J, 2001. **355**: p. 545-561.
96. Sinha, S.N. and V.K. Dua, *Fast atom bombardment mass spectral analysis of three new oxidative products of primaquine*. International Journal of Mass Spectrometry, 2004. **232**(2): p. 151-163.
97. Nitin, M., M. Rajanikanth, J. Lal, K.P. Madhusudanan, and R.C. Gupta, *Liquid chromatography–tandem mass spectrometric assay with a novel method of quantitation for the simultaneous determination of bulaquine and its metabolite, primaquine, in monkey plasma*. Journal of Chromatography B, 2003. **793**(2): p. 253-263.
98. Vale, N., R. Moreira, and P. Gomes, *Characterization of primaquine imidazolidin-4-ones with antimalarial activity by electrospray ionization-ion trap mass spectrometry*. International Journal of Mass Spectrometry, 2008. **270**(1–2): p. 81-93.
99. Vale, N., J. Matos, R. Moreira, and P. Gomes, *Electrospray ionization-ion trap mass spectrometry study of pqaapro and ppproaa mimetic derivatives of the antimalarial primaquine*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2008. **19**(10): p. 1476-1490.
100. Vale, N., J. Matos, R. Moreira, and P. Gomes, *Electrospray ionization mass spectrometry as a valuable tool in the characterization of novel primaquine peptidomimetic derivatives*. European Journal of Mass Spectrometry, 2009. **15**(5): p. 627-640.
101. Hodel, E.M., B. Genton, B. Zanolari, T. Mercier, S. Duong, H.P. Beck, et al. F. Arieu, *Residual antimalarial concentrations before treatment in patients with malaria from cambodia: Indication of drug pressure*. The Journal of Infectious Diseases, 2010. **202**(7): p. 1088-94.
102. Doyle, E., S.E. Fowles, S. Summerfield, and T.J. White, *Rapid determination of tafenoquine in small volume human plasma samples by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, 2002. **769**(1): p. 127-132.

103. Singh, R.P., S. Sabarinath, S.K. Singh, and R.C. Gupta, *A sensitive and selective liquid chromatographic tandem mass spectrometric assay for simultaneous quantification of novel trioxane antimalarials in different biomatrices using sample-pooling approach for high throughput pharmacokinetic studies*. Journal of Chromatography B, 2008. **864**(1–2): p. 52-60.
104. Margout, D., F. Gattacceca, G. Moarbess, S. Wein, C.T.V. Ba, S. Le Pape, et al. F.M.M. Bressolle, *Pharmacokinetic properties and metabolism of a new potent antimalarial n-alkylamidine compound, m64, and its corresponding bioprecursors*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011. **42**(1–2): p. 81-90.
105. Sabarinath, S., R.P. Singh, and R.C. Gupta, *Simultaneous quantification of  $\alpha$ -/ $\beta$ -diastereomers of arteether, sulphadoxine and pyrimethamine: A promising anti-relapse antimalarial therapeutic combination, by liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, 2006. **842**(1): p. 36-42.
106. Li, L., D. Pabbisetty, P. Carvalho, M.A. Avery, J.S. Williamson, and B.A. Avery, *Ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for the determination of artemisinin in rat serum and its application in pharmacokinetics*. Journal of Chromatography B, 2008. **867**(1): p. 131-137.
107. Souppart, C., N. Gauducheau, N. Sandrenan, and F. Richard, *Development and validation of a high-performance liquid chromatography–mass spectrometry assay for the determination of artemether and its metabolite dihydroartemisinin in human plasma*. Journal of Chromatography B, 2002. **774**(2): p. 195-203.
108. Shi, B., Y. Yu, Z. Li, L. Zhang, Y. Zhong, S. Su, and S. Liang, *Quantitative analysis of artemether and its metabolite dihydroartemisinin in human plasma by lc with tandem mass spectrometry*. Chromatographia, 2006. **64**(9-10): p. 523-530.
109. Huang, L., A.L. Jayewardene, X. Li, F. Marzan, P.S. Lizak, and F.T. Aweeka, *Development and validation of a high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the determination of artemether and its active metabolite dihydroartemisinin in human plasma*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2009. **50**(5): p. 959-965.
110. Hanpithakpong, W., B. Kamanikom, P. Singhasivanon, N.J. White, N.P.J. Day, and N. Lindegardh, *A liquid chromatographic-tandem mass spectrometric*



- method for determination of artemether and its metabolite dihydroartemisinin in human plasma*. Bioanalysis, 2009. **1**(1): p. 37-46.
111. Liu, T., F. Du, Y. Wan, F. Zhu, and J. Xing, *Rapid identification of phase i and ii metabolites of artemisinin antimalarials using ltq-orbitrap hybrid mass spectrometer in combination with online hydrogen/deuterium exchange technique*. Journal of Mass Spectrometry, 2011. **46**(8): p. 725-733.
112. Lindegardh, N., W. Hanpithakpong, B. Kamanikom, P. Singhasivanon, D. Socheat, P. Yi, et al. N.P.J. Day, *Major pitfalls in the measurement of artemisinin derivatives in plasma in clinical studies*. Journal of Chromatography B, 2008. **876**(1): p. 54-60.
113. Kaur, H., M.D. Green, D.M. Hostetler, F.M. Fernández, and P.N. Newton, *Antimalarial drug quality: Methods to detect suspect drugs*. Therapy, 2010. **7**(1): p. 49-57.
114. Hall, K.A., P.N. Newton, M.D. Green, M. De Veij, P. Vandenabeele, D. Pizzanelli, et al. F.M. Fernandez, *Characterization of counterfeit artesunate antimalarial tablets from southeast asia*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 2006. **75**(5): p. 804-811.
115. Ricci, C., L. Nyadong, F. Yang, F.M. Fernandez, C.D. Brown, P.N. Newton, and S.G. Kazarian, *Assessment of hand-held raman instrumentation for in situ screening for potentially counterfeit artesunate antimalarial tablets by ft-raman spectroscopy and direct ionization mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, 2008. **623**(2): p. 178-186.
116. Nayyar, G.M.L., J.G. Breman, P.N. Newton, and J. Herrington, *Poor-quality antimalarial drugs in southeast asia and sub-saharan africa*. The Lancet Infectious Diseases, 2012. **12**(6): p. 488-496.
117. Ricci, C., L. Nyadong, F.M. Fernandez, P.N. Newton, and S.G. Kazarian, *Combined fourier-transform infrared imaging and desorption electrospray-ionization linear ion-trap mass spectrometry for analysis of counterfeit antimalarial tablets*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2007. **387**(2): p. 551-559.
118. Fernández, F.M., R.B. Cody, M.D. Green, C.Y. Hampton, R. Mcgready, S. Sengaloundeth, et al. P.N. Newton, *Characterization of solid counterfeit drug samples by desorption electrospray ionization and direct-analysis-in-real-time*

- coupled to time-of-flight mass spectrometry*. ChemMedChem, 2006. **1**(7): p. 702-705.
119. Nyadong, L., S. Late, M.D. Green, A. Banga, and F.M. Fernández, *Direct quantitation of active ingredients in solid artesunate antimalarials by noncovalent complex forming reactive desorption electrospray ionization mass spectrometry*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2008. **19**(3): p. 380-388.
120. Nyunt, M., J. Pisciotto, A.B. Feldman, P. Thuma, P.F. Scholl, P.A. Demirev, et al. D.J. Sullivan, *Detection of plasmodium falciparum in pregnancy by laser desorption mass spectrometry*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 2005. **73**(3): p. 485-490.
121. Pirmohamed, M., *Drug metabolism*. Medicine, 2008. **36**(7): p. 355-359.
122. Pereira, D.G., *Importância do metabolismo no planejamento de fármacos*. Química Nova, 2007. **30**(1): p. 171.
123. Ionescu, C. and M.R. Caira, *Drug metabolism: Current concepts*. Vol. 7. 2006: Springer.
124. Hoffmann, S.A., U. Müller-Vieira, K. Biemel, D. Knobloch, S. Heydel, M. Lübberstedt, et al. K. Zeilinger, *Analysis of drug metabolism activities in a miniaturized liver cell bioreactor for use in pharmacological studies*. Biotechnology and Bioengineering, 2012. **109**(12): p. 3172-3181.
125. Sheweita, S.A., *Drug-metabolizing enzymes mechanisms and functions*. Current drug metabolism, 2000. **1**(2): p. 107-132.
126. Barreiro, J., J. Silva, and C. Fraga, *Noções básicas do metabolismo de fármacos*. Rev Química Nova, 1996. **19**: p. 441-451.
127. Guengerich, F.P., *Cytochrome p450 and chemical toxicology*. Chemical Research in Toxicology, 2007. **21**(1): p. 70-83.
128. Zanger, U.M. and M. Schwab, *Cytochrome p450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation*. Pharmacology & Therapeutics, 2013. **138**(1): p. 103-141.
129. Patrick, G.L., *An introduction to medicinal chemistry* 2013: Oxford university press.
130. Miners, J.O. and D.J. Birkett, *Cytochrome p4502c9: An enzyme of major importance in human drug metabolism*. British Journal of Clinical

- Pharmacology, 1998. **45**(6): p. 525-538.
131. Wilkening, S., F. Stahl, and A. Bader, *Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line hepg2 with regard to their biotransformation properties*. Drug Metabolism and Disposition, 2003. **31**(8): p. 1035-1042.
  132. Testa, B. and S.D. Krämer, *The biochemistry of drug metabolism – an introduction*. Chemistry & biodiversity, 2006. **3**(10): p. 1053-1101.
  133. Xu, C., C.Y.-T. Li, and A.-N.T. Kong, *Induction of phase i, ii and iii drug metabolism/transport by xenobiotics*. Archives of pharmacal research, 2005. **28**(3): p. 249-268.
  134. Denisov, I.G., T.M. Makris, S.G. Sligar, and I. Schlichting, *Structure and chemistry of cytochrome p450*. Chemical reviews, 2005. **105**(6): p. 2253-2278.
  135. Costa, E.M.D.M.B., V. De Oliveira, and F.C. Pimenta, *Citocromos p450 e biotransformação microbiana*. Revista de Patologia Tropical, 2008. **33**(1).
  136. Wolff, M.E., *Book review of drug metabolism. Chemical and enzymatic aspects*. Journal of Medicinal Chemistry, 2008. **51**(17): p. 5468-5468.
  137. Makris, T., R. Davydov, I. Denisov, B. Hoffman, and S. Sligar, *Mechanistic enzymology of oxygen activation by the cytochromes p450*. Drug Metabolism Reviews, 2002. **34**(4): p. 691.
  138. Hata, M., Y. Hirano, T. Hoshino, R. Nishida, and M. Tsuda, *Theoretical study on compound i formation in monooxygenation mechanism by cytochrome p450*. The Journal of Physical Chemistry B, 2004. **108**(30): p. 11189-11195.
  139. Gibson, G.G. and P. Skett, *Introduction to drug metabolism* 2001: Nelson Thornes.
  140. Fabregat, A., O.J. Pozo, J. Marcos, J. Segura, and R. Ventura, *Use of lc-ms/ms for the open detection of steroid metabolites conjugated with glucuronic acid*. Analytical Chemistry, 2013. **85**(10): p. 5005-5014.
  141. Yan, Z. and G. Caldwell, *Optimization in drug discovery: In vitro methods* 2004: Humana Press.
  142. Masimirembwa, C.M., U. Bredberg, and T.B. Andersson, *Metabolic stability for drug discovery and development: Pharmacokinetic and biochemical challenges*. Clinical Pharmacokinetics, 2003. **42**(6): p. 515-528.
  143. Di, L., E.H. Kerns, S.Q. Li, and S.L. Petusky, *High throughput microsomal*

- stability assay for insoluble compounds*. International Journal of Pharmaceutics, 2006. **317**(1): p. 54-60.
144. Rodríguez-Antona, C., M.T. Donato, A. Boobis, R.J. Edwards, P.S. Watts, J.V. Castell, and M.J. Gómez-Lechón, *Cytochrome p450 expression in human hepatocytes and hepatoma cell lines: Molecular mechanisms that determine lower expression in cultured cells*. Xenobiotica, 2002. **32**(6): p. 505-520.
145. Nutley, B.P., F.I. Raynaud, S.C. Wilson, P.M. Fischer, A. Hayes, P.M. Goddard, et al. P. Workman, *Metabolism and pharmacokinetics of the cyclin-dependent kinase inhibitor r-roscovitine in the mouse*. Molecular Cancer Therapeutics, 2005. **4**(1): p. 125-139.
146. Valko, K. and D.P. Reynolds, *High-throughput physicochemical and in vitro admet screening: A role in pharmaceutical profiling*. American Journal of Drug Delivery, 2005. **3**(2): p. 83-100.
147. Hsieh, Y., L. Favreau, J. Schwerdt, and K.C. Cheng, *Supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometric method for analysis of pharmaceutical compounds in metabolic stability samples*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006. **40**(3): p. 799-804.
148. Nordman, N., T. Sikanen, M.-E. Moilanen, S. Aura, T. Kotiaho, S. Franssila, and R. Kostianen, *Rapid and sensitive drug metabolism studies by su-8 microchip capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2011. **1218**(5): p. 739-745.
149. Baker, J.K., R.H. Yarber, N. Nanayakkara, J.D. Mcchesney, F. Homo, and I. Landau, *Effect of aliphatic side-chain substituents on the antimalarial activity and on the metabolism of primaquine studied using mitochondria and microsome preparations*. Pharmaceutical research, 1990. **7**(1): p. 91-95.
150. Constantino, L., P. Paixao, R. Moreira, M. Portela, V. Do Rosario, and J. Iley, *Metabolism of primaquine by liver homogenate fractions: Evidence for monoamine oxidase and cytochrome p450 involvement in the oxidative deamination of primaquine to carboxyprimaquine*. Experimental and Toxicologic Pathology, 1999. **51**(4): p. 299-303.
151. Pybus, B.S., J.C. Sousa, X. Jin, J.A. Ferguson, R.E. Christian, R. Barnhart, et al. M.P. Kozar, *Cyp450 phenotyping and accurate mass identification of metabolites of the 8-aminoquinoline, anti-malarial drug primaquine*. Malar J,

2012. **11**(259): p. 10.1186.
152. Jin, X., B. Pybus, S. Marcisisin, T. Logan, T. Luong, J. Sousa, et al. D. Carroll, *An lc–ms based study of the metabolic profile of primaquine, an 8-aminoquinoline antiparasitic drug, with an in vitro primary human hepatocyte culture model*. European journal of drug metabolism and pharmacokinetics, 2014. **39**(2): p. 139-146.
153. Vale, N., I. Fernandes, R. Moreira, N. Mateus, and P. Gomes, *Comparative analysis of in vitro rat liver metabolism of the antimalarial primaquine and a derived imidazoquine*. Drug metabolism letters, 2012. **6**(1): p. 15-25.
154. Bolchoz, L.J.C., R.A. Budinsky, D.C. Mcmillan, and D.J. Jollow, *Primaquine-induced hemolytic anemia: Formation and hemotoxicity of the arylhydroxylamine metabolite 6-methoxy-8-hydroxylaminoquinoline*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2001. **297**(2): p. 509-515.
155. Vásquez-Vivar, J. and O. Augusto, *Hydroxylated metabolites of the antimalarial drug primaquine. Oxidation and redox cycling*. Journal of Biological Chemistry, 1992. **267**(10): p. 6848-6854.
156. Cashman, J.R., *Structural and catalytic properties of the mammalian flavin-containing monooxygenase*. Chemical Research in Toxicology, 1995. **8**(2): p. 165-181.
157. Posner, G.H. and P.M. O'Neill, *Knowledge of the proposed chemical mechanism of action and cytochrome p450 metabolism of antimalarial trioxanes like artemisinin allows rational design of new antimalarial peroxides*. Accounts of Chemical Research, 2004. **37**(6): p. 397-404.
158. White, N.J., *Qinghaosu (artemisinin): The price of success*. Science, 2008. **320**(5874): p. 330-334.
159. O'Neill, P.M., A. Miller, L.P. Bishop, S. Hindley, J.L. Maggs, S.A. Ward, et al. G.H. Posner, *Synthesis, antimalarial activity, biomimetic iron (ii) chemistry, and in vivo metabolism of novel, potent c-10-phenoxy derivatives of dihydroartemisinin*. Journal of Medicinal Chemistry, 2001. **44**(1): p. 58-68.
160. Ressurreição, A.S., D. Gonçalves, A.R. Siteo, I.S. Albuquerque, J. Gut, A. Góis, et al. R. Moreira, *Structural optimization of quinolon-4(1h)-imines as dual-stage antimalarials: Toward increased potency and metabolic stability*. Journal of Medicinal Chemistry, 2013. **56**(19): p. 7679-7690.

161. Madeira, P.J.A., A.R.F. Siteo, D. Gonçalves, T. Rodrigues, R.C. Guedes, F. Lopes, et al. M.R. Bronze, *Antiplasmodial drugs in the gas phase: A cid and dft study of quinolon-4 (1h)-imine derivatives*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2014. **25**(9): p. 1650-1661.
162. Chang, T.K., C.L. Crespi, and D.J. Waxman, *Spectrophotometric analysis of human cyp2e1-catalyzed p-nitrophenol hydroxylation*, in *Cytochrome p450 protocols* 2006, Springer. p. 127-131.

# Anexos

---

**ANEXOS**



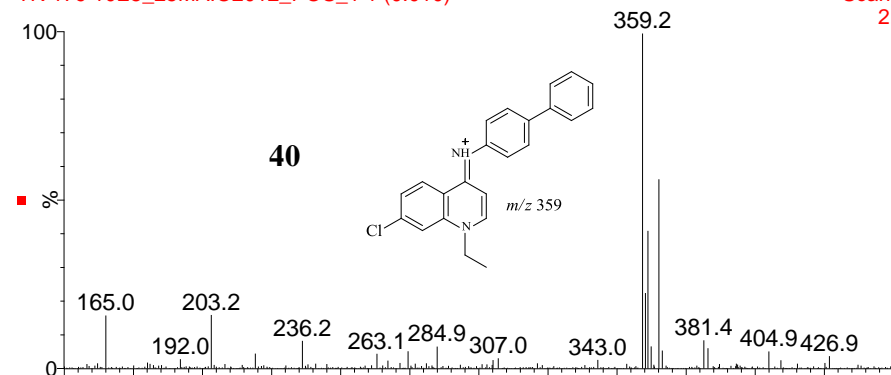


## **ANEXO I**

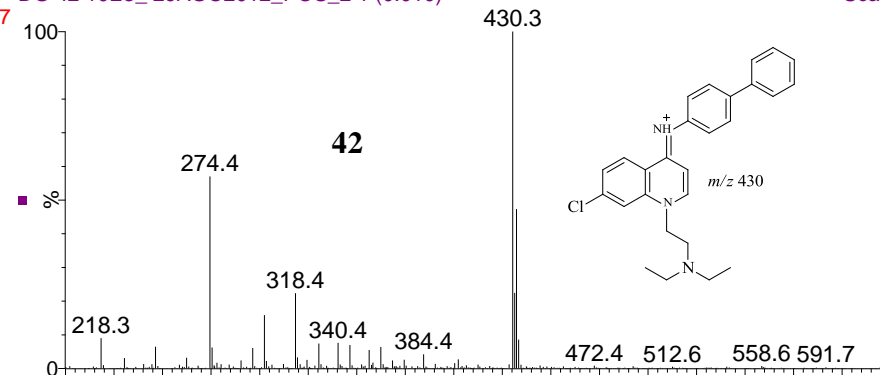
### **Derivados das Quinolon-4(1*H*)-Iminas**

ESI+ 3.0kV/30V

TR 179 10E5\_25MAIO2012\_POS\_1 1 (0.010)



ESI+ 3.0kV/30V

Scan ES+ DG 42 10E5\_29AGO2012\_POS\_2 1 (0.010)  
2.73e7

Scan ES+  
1.14e8

TR 209 T0\_29AGO2012\_POS\_1 1 (0.010)

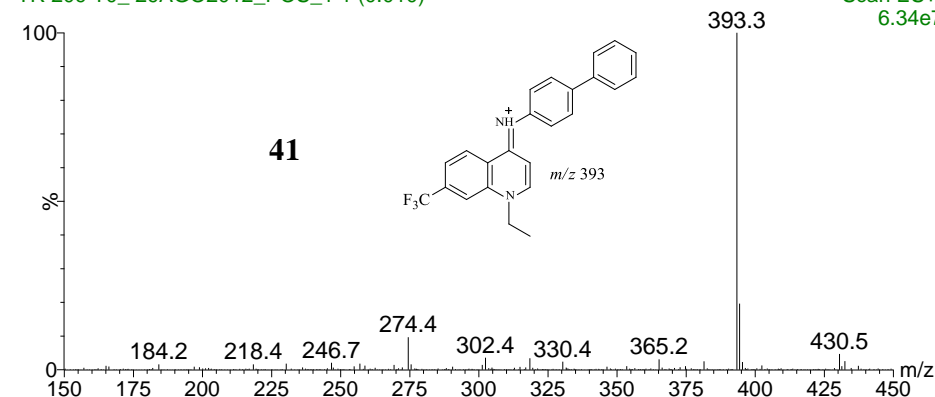
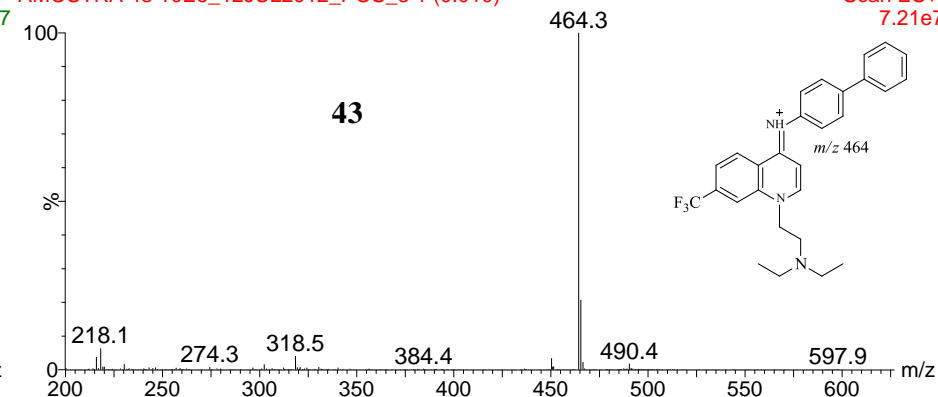

Scan ES+ AMOSTRA 43 10E5\_12JUL2012\_POS\_3 1 (0.010)  
6.34e7

Scan ES+  
7.21e7

Figura I.1 - Espectros de massa dos compostos 40-43

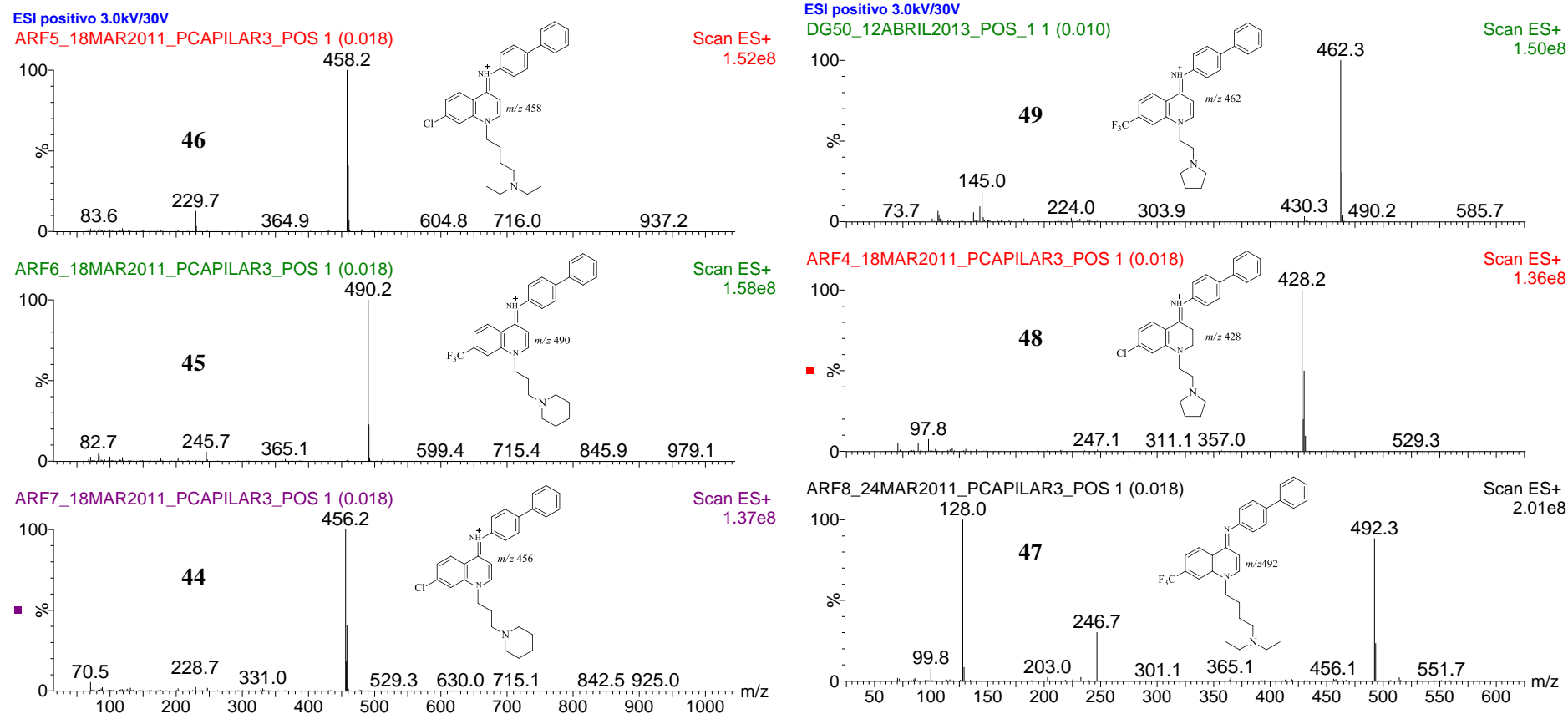


Figura I.2 - Espectros de massa dos compostos 44-47

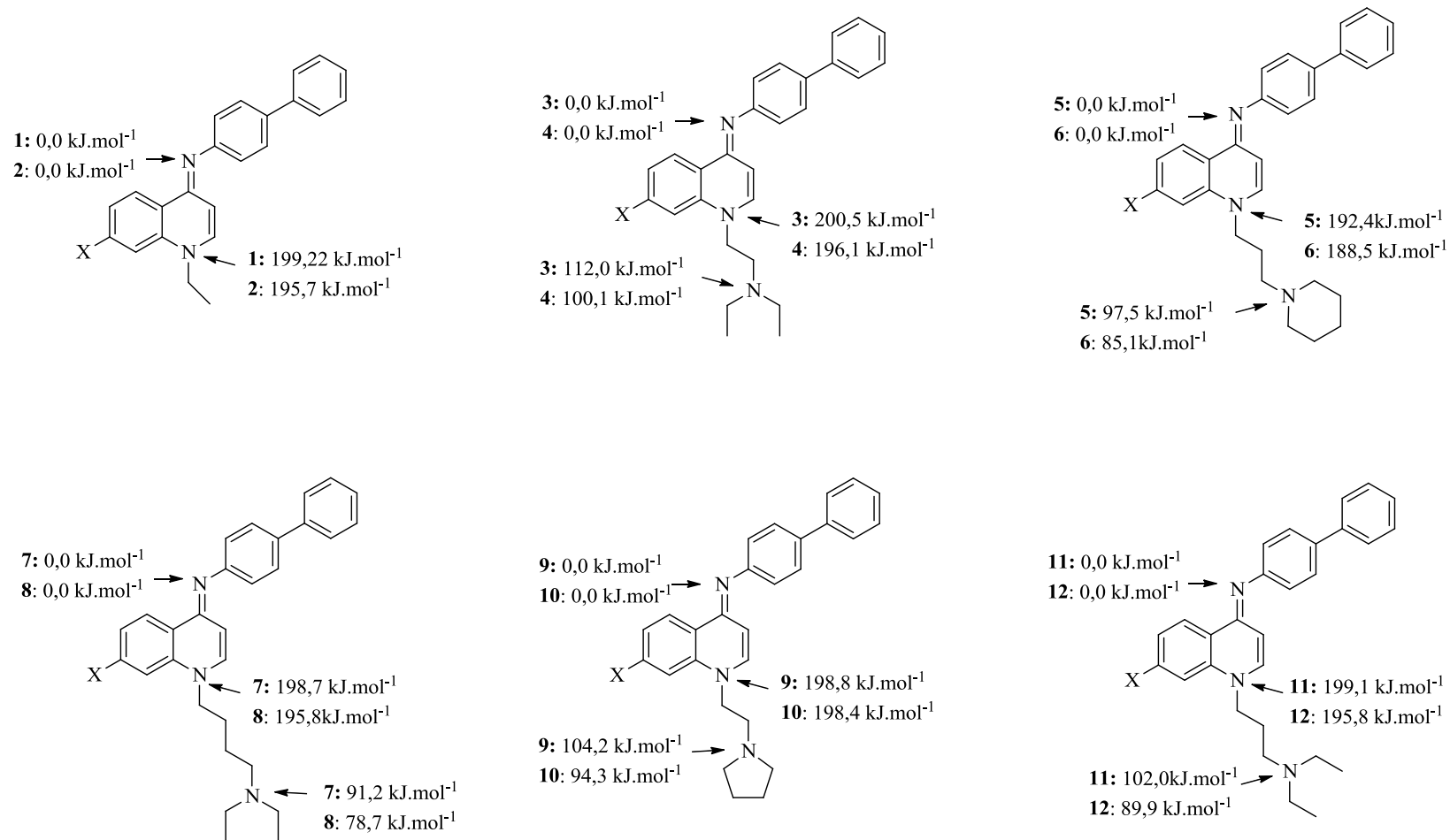
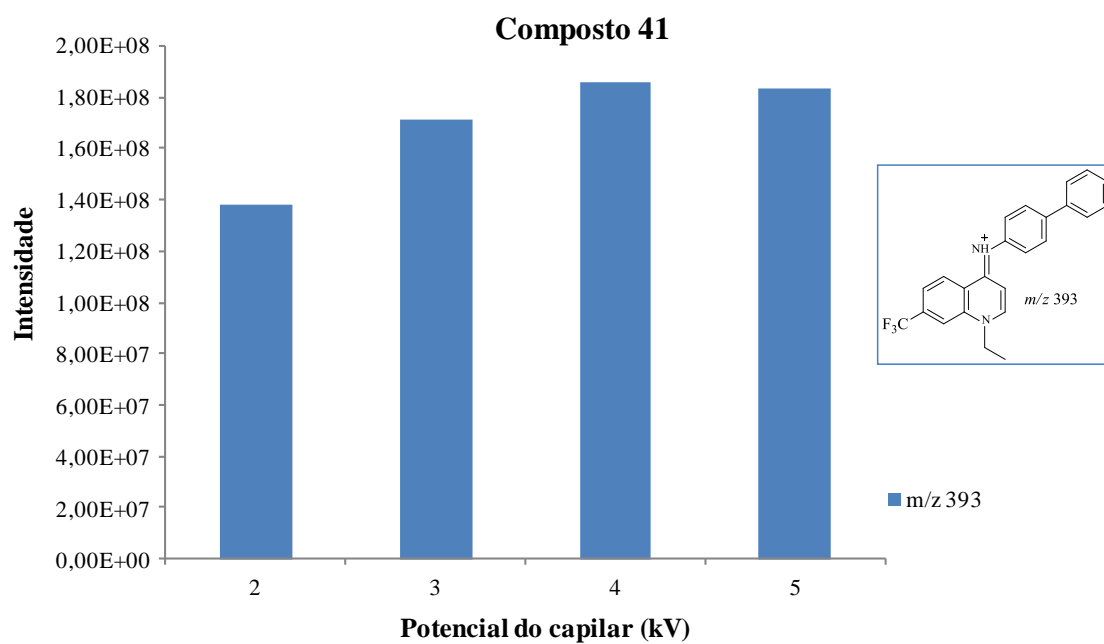
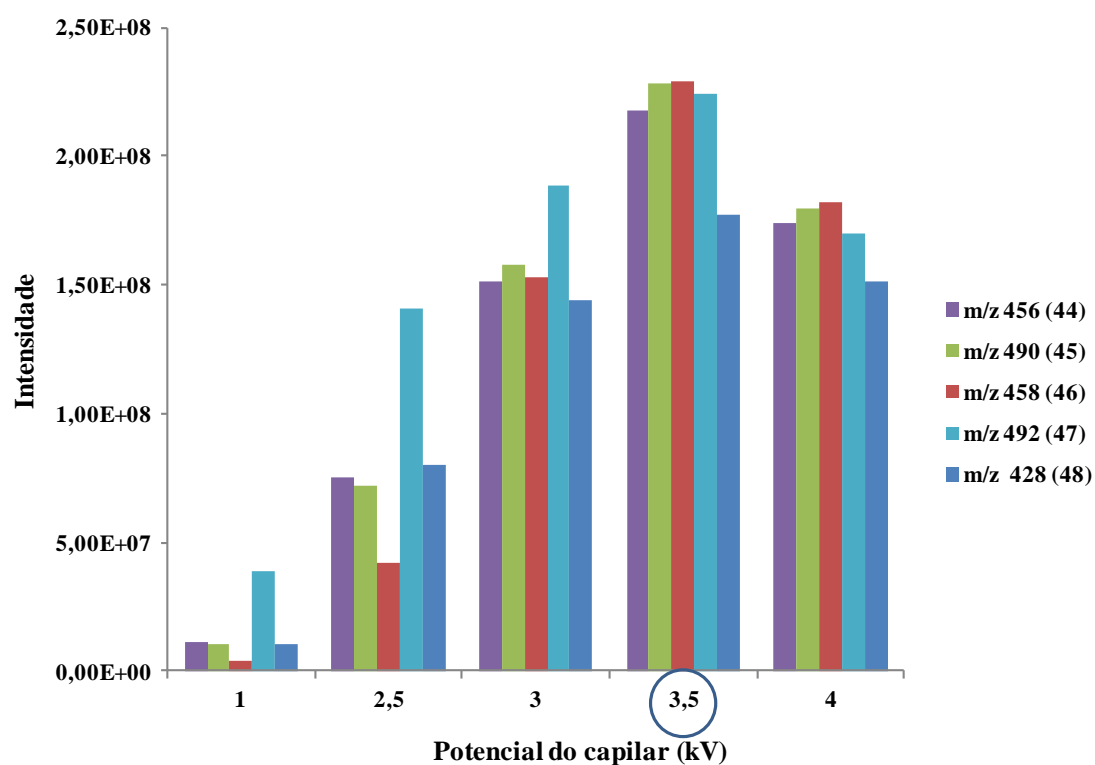


Figura 1.2 – Locais sugeridos para a protonação



**Figura I.3 – Efeito da variação da voltagem do capilar no sinal instrumental, obtido para o composto 41**



**Figura I.4 – Efeito da variação da voltagem do capilar no sinal instrumental, obtido para os composto 44-48**

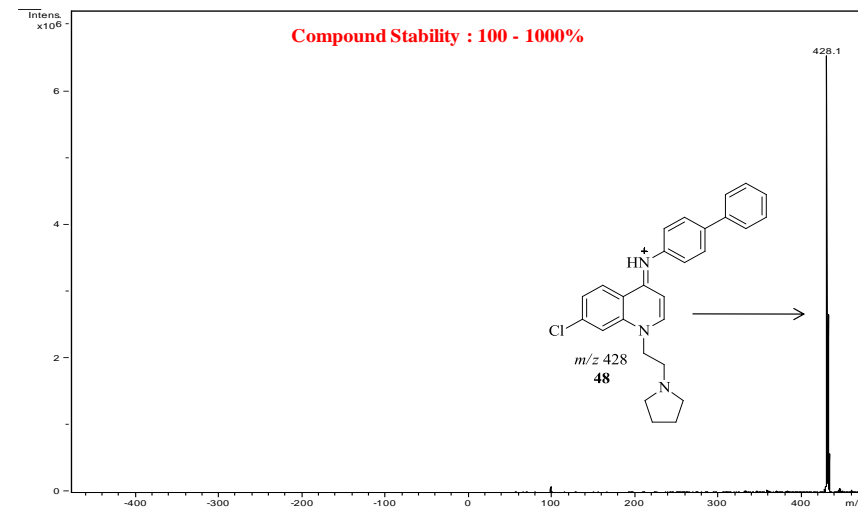
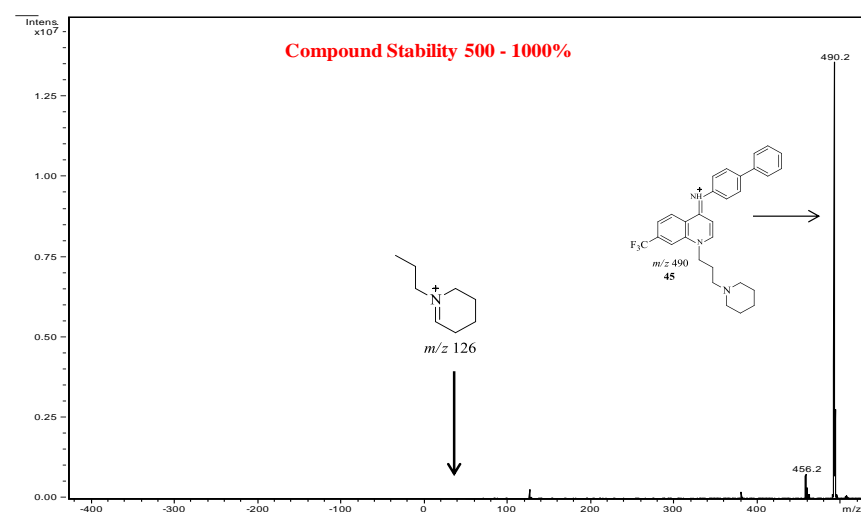
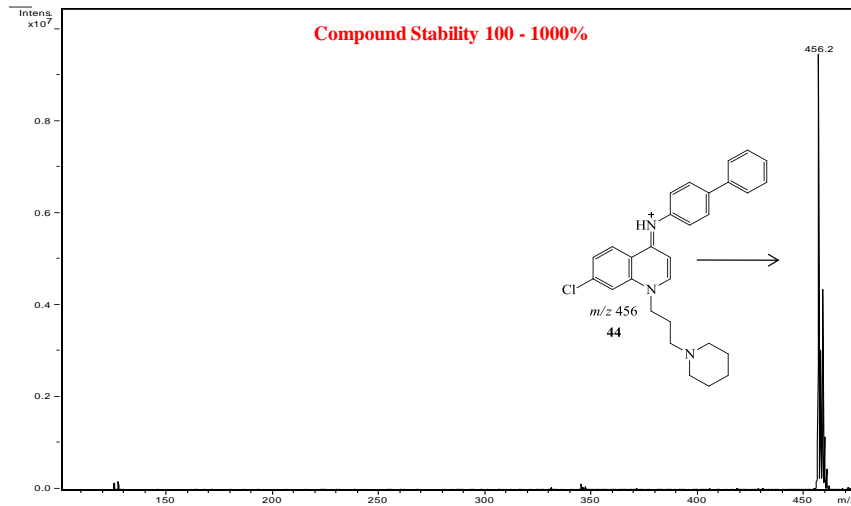
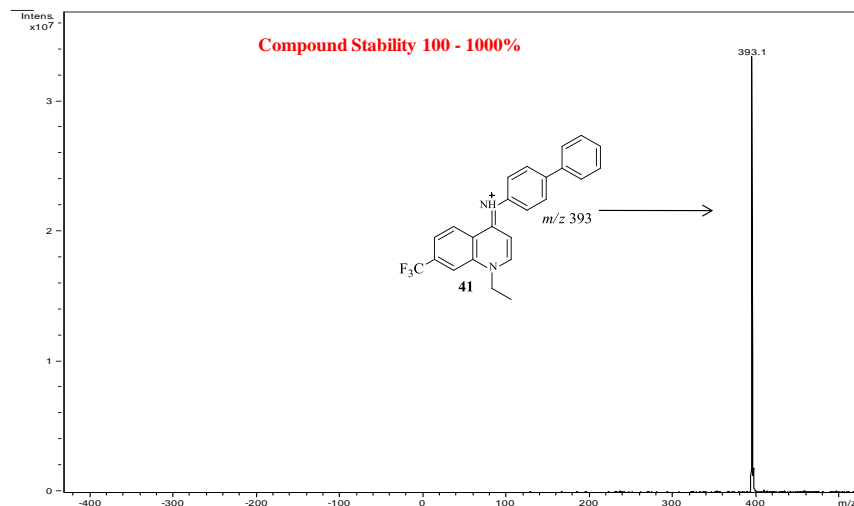


Figura I.4A– Espectros MS das moléculas protonadas dos compostos 41, 44, 45 e 48

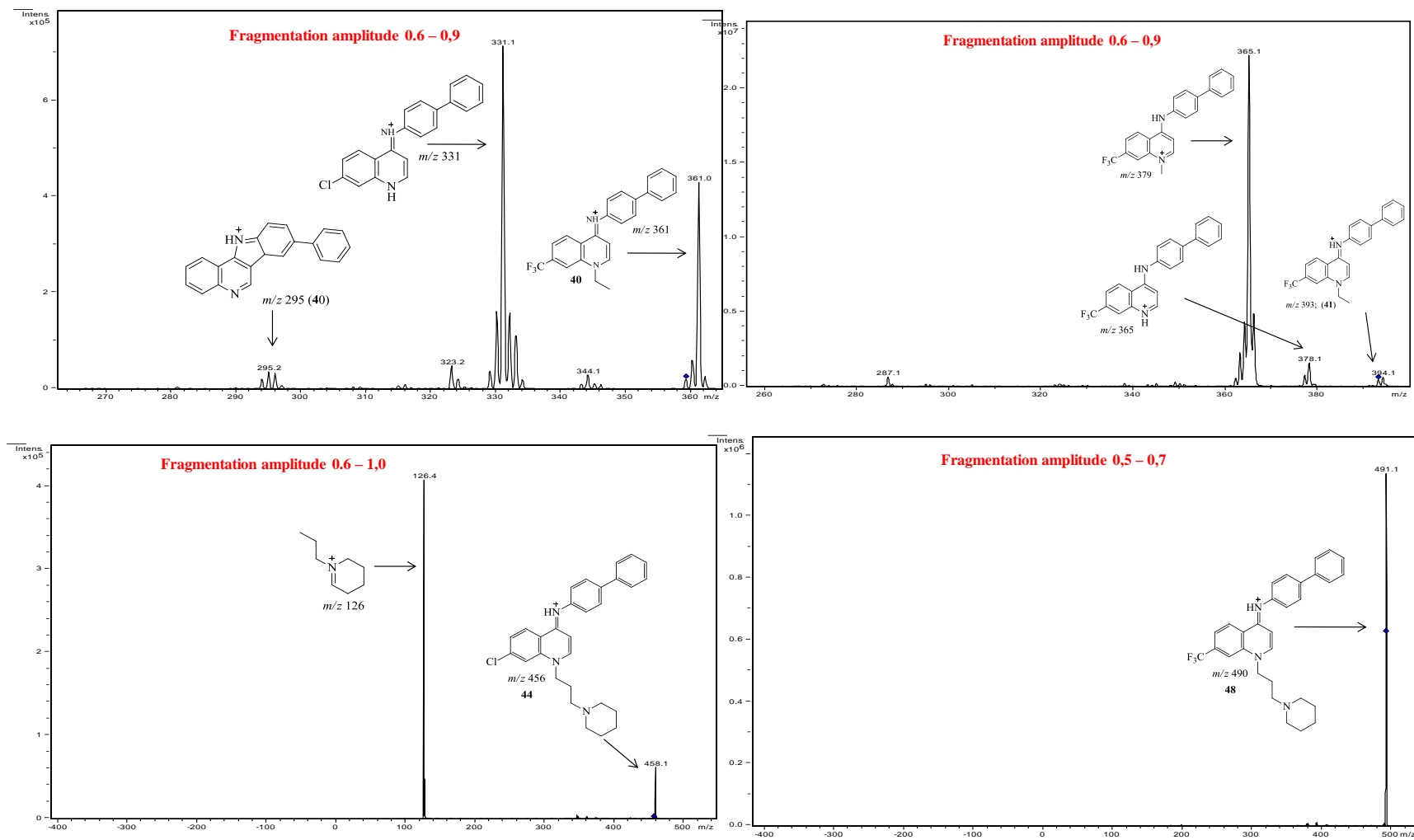


Figura I.4B – Espectros MS/MS das moléculas protonadas dos compostos 40, 41, 46 e 48



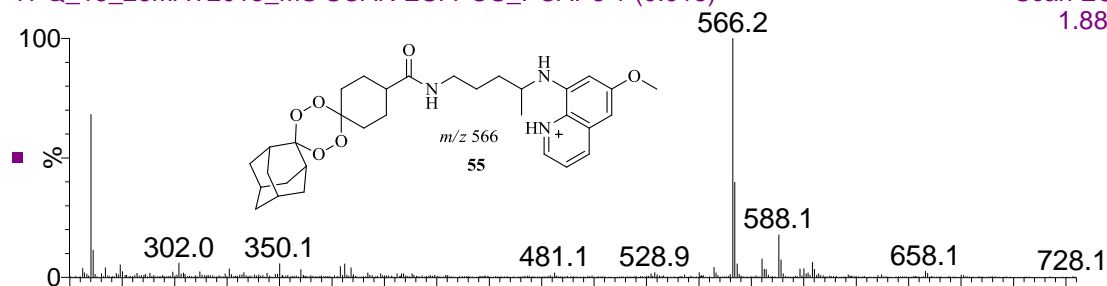


**ANEXO II – DERIVADOS ENDOPERÓXIDOS HÍBRIDOS  
DA PQ-ART**

ESI+/3.0kV/30V

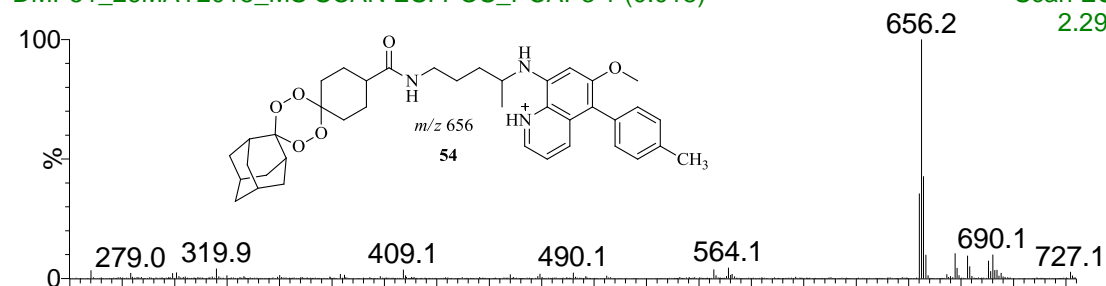
TPQ\_15\_26MAY2015\_MS SCAN ESI POS\_PCAP3 1 (0.018)

Scan ES+  
1.88e7



DMP51\_26MAY2015\_MS SCAN ESI POS\_PCAP3 1 (0.018)

Scan ES+  
2.29e7



DPM41\_15\_26MAY2015\_MS SCAN ESI POS\_PCAP3 1 (0.018)

Scan ES+  
1.49e7

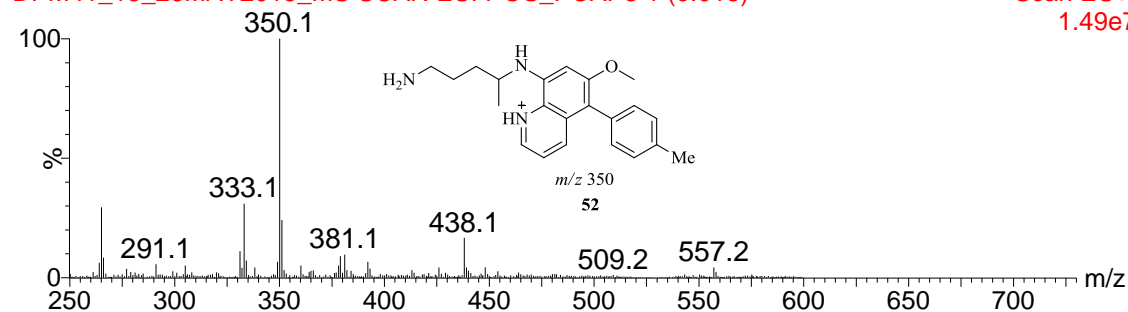


Figura II.1 – Espectros de massa dos compostos 52, 54 e 55

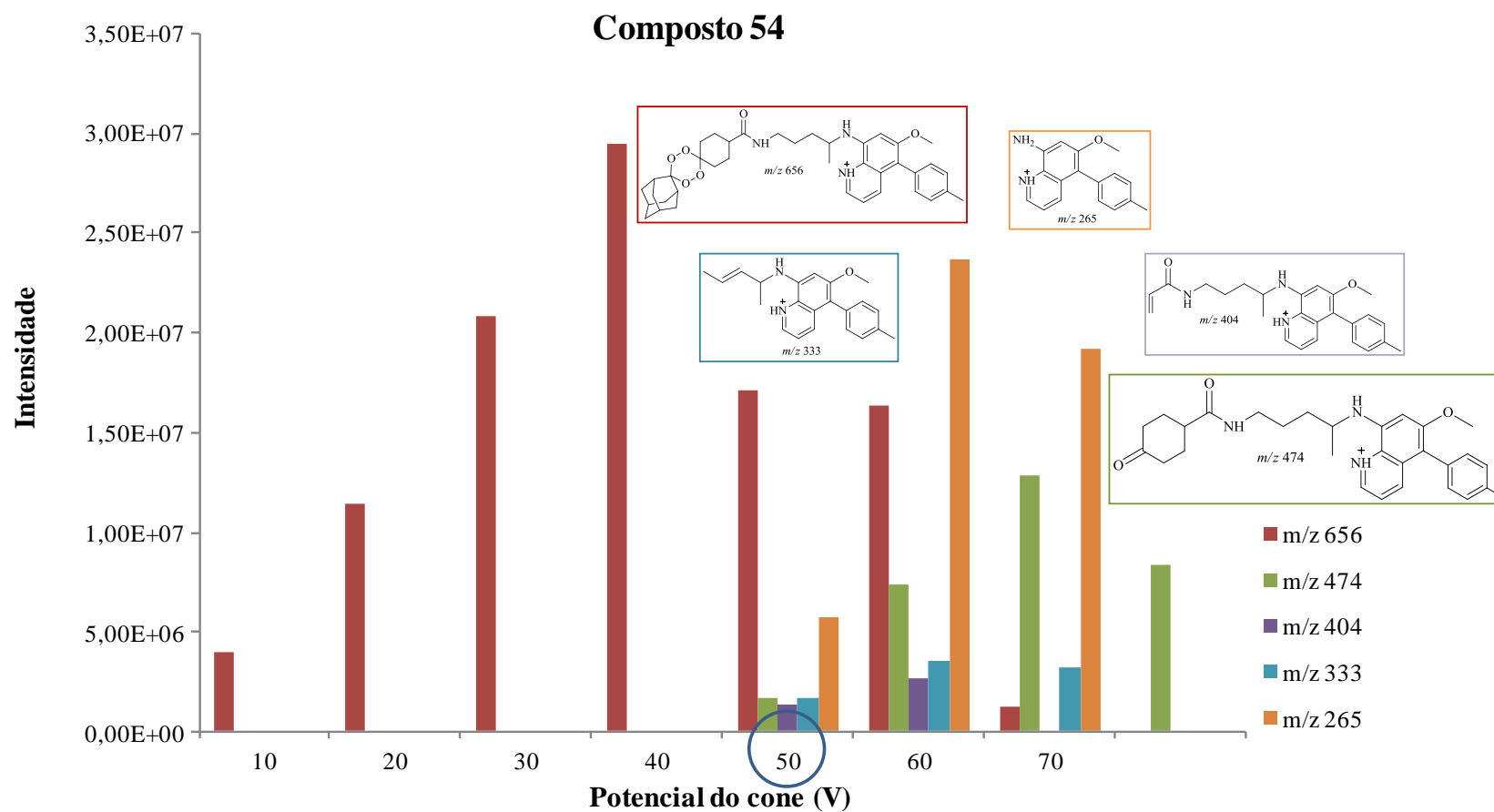
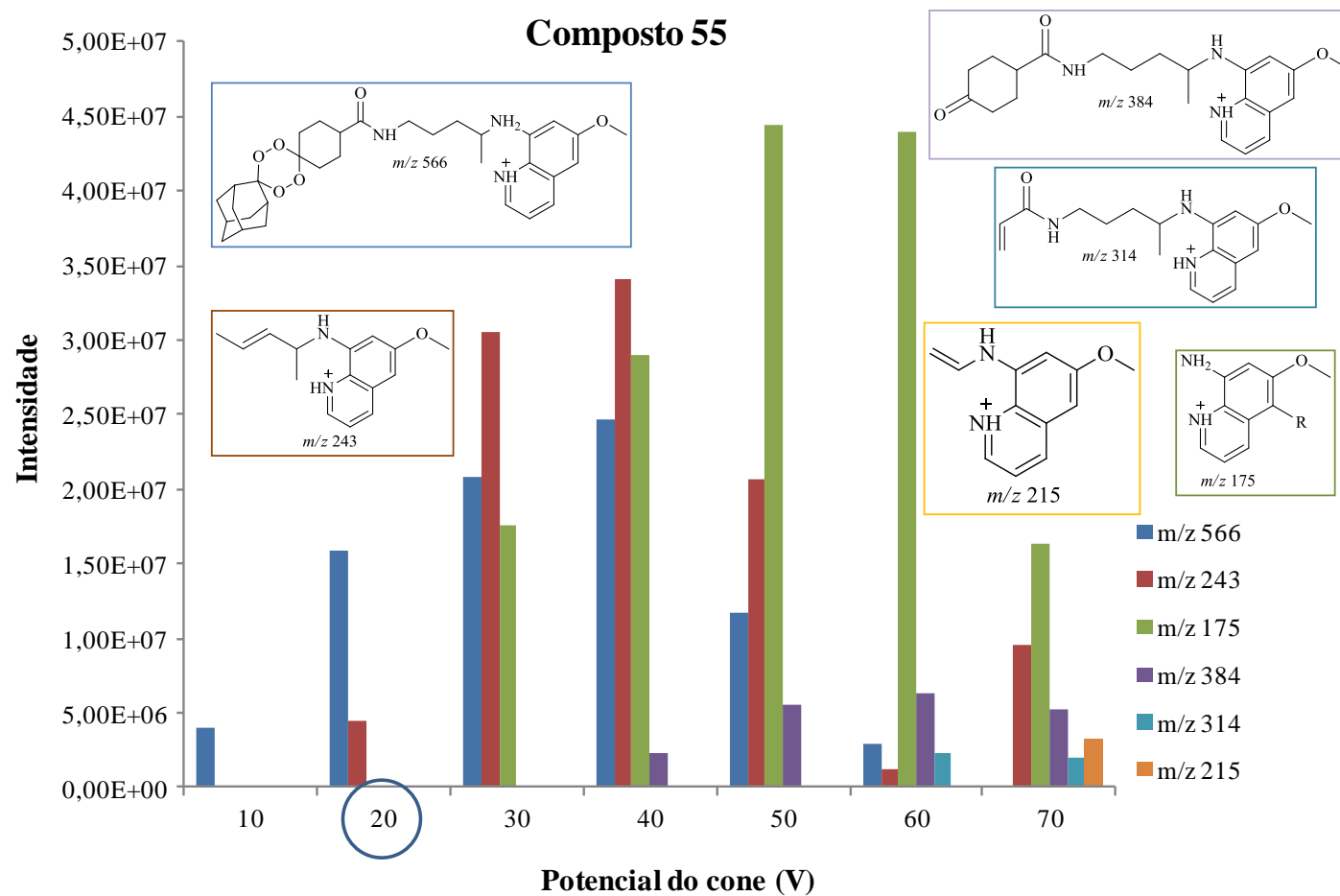
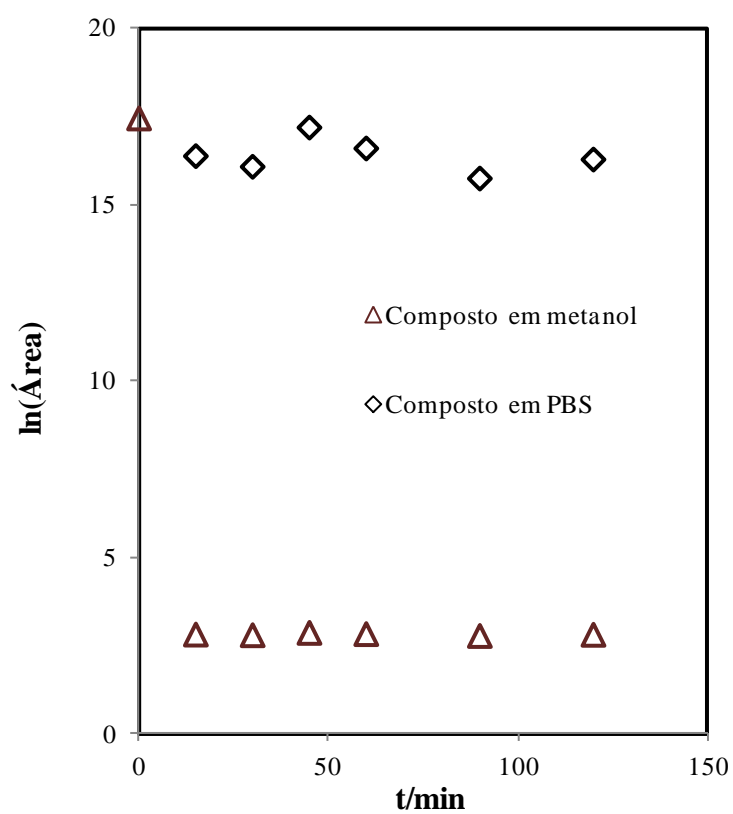


Figura II.2 - Variação da intensidade do sinal dos iões detetados correspondentes ao composto 54, em função da voltagem de cone aplicada

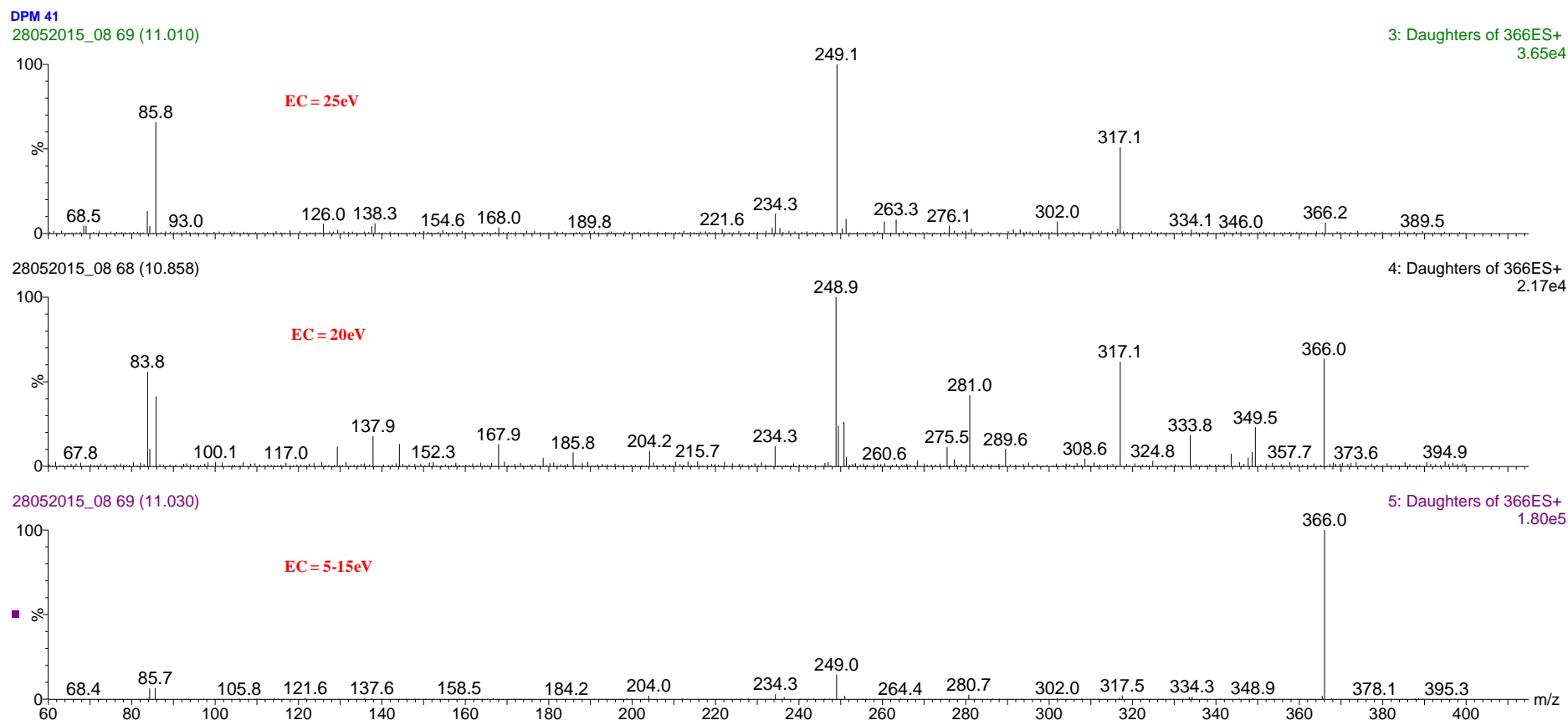


**Figura II.3 - Variação da intensidade do sinal dos iões detetados correspondentes ao composto 55, em função da voltagem de cone aplicada**

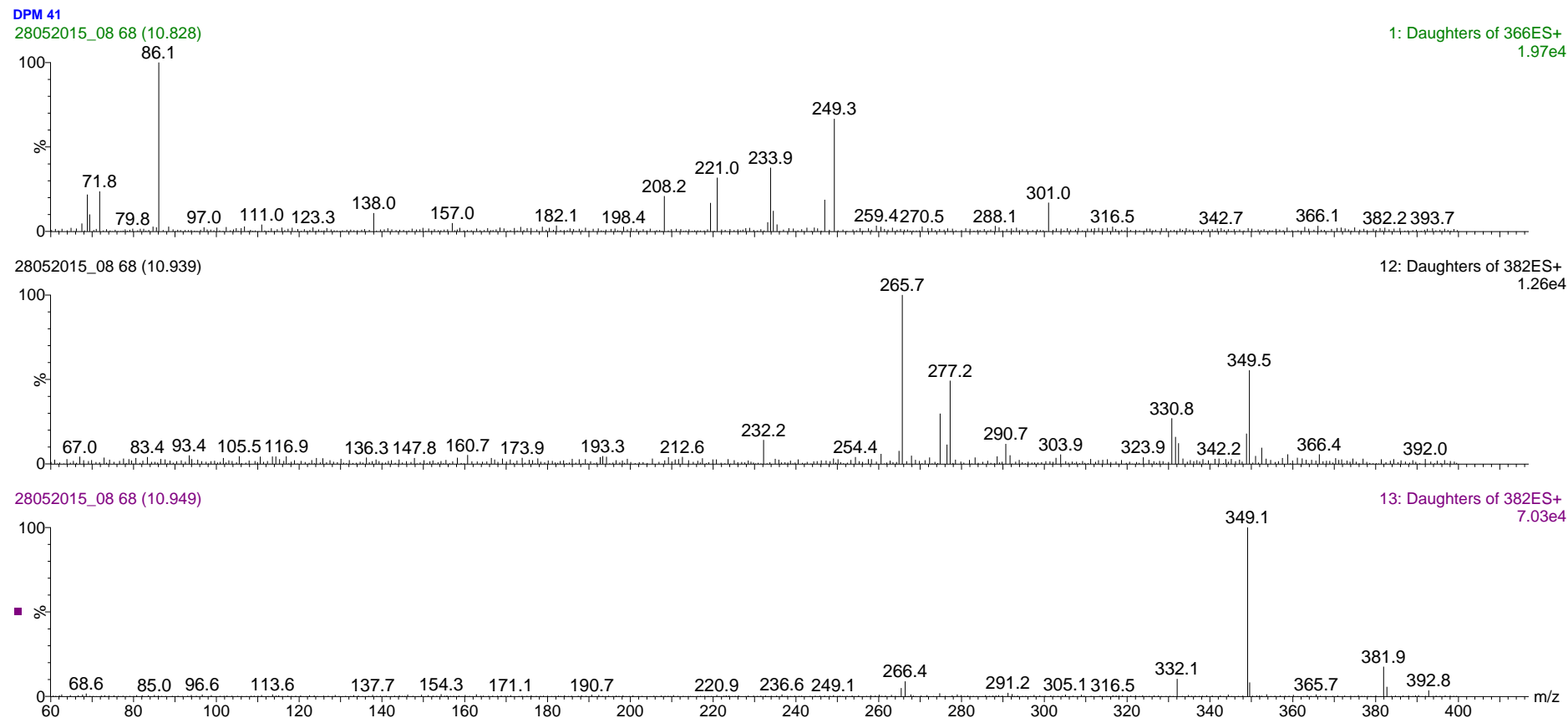


**Figura II.4 - Variação da área dos compostos 54 em PBS e em metanol, em função do tempo**

44t120MM  
20102014\_21



**Figura II.6 - Padrão de fragmentação de  $m/z$  366, detetado no espectro de massa do composto 52, obtido po aplicação de energias de colisão entre 5 e 25 eV**



**Figura II.7 - Padrão de fragmentação de m/z 382 detetado no espectro de massa do composto 52 obtido po aplicação de energias de colisão entre 5 e 25 eV**







---

# **Contribution of Mass Spectrometry to the Study of Antimalarial Agents**

---

Ana Raquel Siteo, Francisca Lopes, Rui Moreira,  
Ana Coelho and Maria Rosário Bronze

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/56225>

---

## **1. Introduction**

Mass spectrometry (MS) has become a powerful analytical tool for qualitative and quantitative applications, providing information about the structure and purity of compounds, and also about the chemical composition of complex samples.

The most recent applications of mass spectrometry are oriented towards biochemical applications such as proteome, metabolome and drug discovery. During the last decade, mass spectrometry has progressed rapidly and an evolution has been observed in the type of applications, software and equipments. Atmospheric pressure ionization sources are now used, an analyser based on a new concept (the orbitrap) was recently developed, existing ones were modified, and new hybrid instruments were developed using combinations of different analysers, depending on applications. One of the major trends was the transition to high resolution/accurate mass analysis, made routine by new MS instruments. The use of separation techniques as gas chromatography (GC), liquid chromatography (LC) and capillary electrophoresis (CE) coupled with mass spectrometry and tandem mass spectrometry, expanded the interest in this methodology.

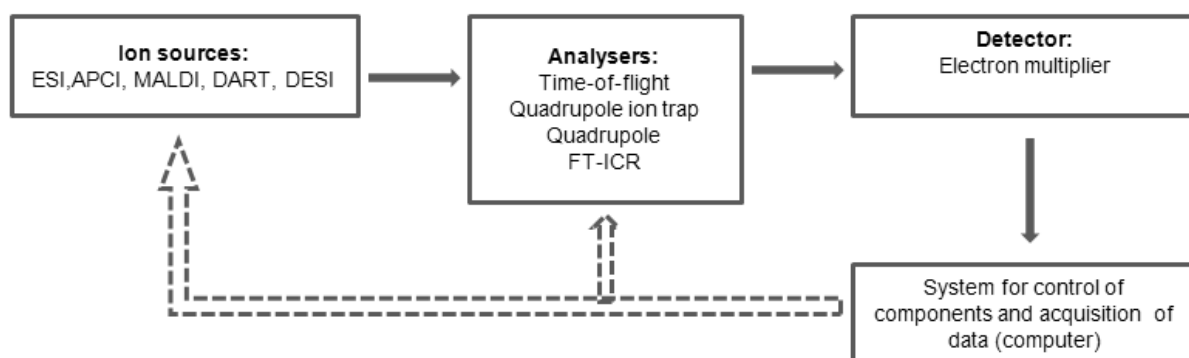
In this chapter are presented general aspects related with characteristics of mass spectrometry equipments. The contribution of this technique to new discoveries concerning one of the major infectious diseases in man, malaria, is also discussed.

## **2. Basics of mass spectrometry**

Mass spectrometry is a technique used to analyse from small inorganic molecules to biological macromolecules and relies on the formation of gas-phase ions (positively or negatively

charged) that are isolated based on their mass-to-charge ratio ( $m/z$ ). In order to achieve this state, the sample must be volatilized and this may become a problem to biological samples, as biomolecules have usually high molecular mass and high polarity, factors that limit their volatility.

All mass spectrometers share common components as an ionization source, a mass analyser and a detector (Fig. 1). As there are available equipments with different specifications, even from the same supplier, it is necessary to choose carefully the most adequate equipment for each type of application.



**Figure 1.** Basic components in a mass spectrometer. ESI, electrospray ionization, APCI, atmospheric-pressure chemical ionization; MALDI, Matrix-Assisted Laser Desorption ionization; DESI: Desorption Electrospray Ionization; DART: Direct Analysis in Real Time; FT-ICR: Fourier transform ion cyclotron resonance (adapted from Glish & Vachet, 2003)

In order to achieve this state, the sample must be volatilized and this may become a problem to biological samples, as biomolecules have usually high molecular mass and high polarity, factors that limit their volatility.

Different ionization techniques may be used in mass spectrometry equipments, depending on the need of molecule disruption for the induction of ion formation. These techniques may perform strong and soft ionization processes. Soft ionization methods, like fast atomic bombardment (FAB), liquid secondary ion mass spectrometry (LSIMS), matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) and electrospray ionization (ESI) allow the detection of molecular ions and are more suitable for the analysis of biomolecules and non-purified analytes. The ions are generated by protonation, deprotonation or formation of adducts. In table 1 are summarized some of the main characteristics of the most used ionization methods.

The use of FAB is useful to assign the molecular ion peaks. The sample is dissolved in a suitable liquid matrix, with low vapour pressure (e.g. diethanolamine, triethanolamine, glycerol, thioglycerol or 3-nitrobenzyl alcohol), inserted into the mass spectrometer and bombarded with high energy argon or xenon atoms, providing efficient means to analyze polar, ionic, thermally labile, energetically labile, and high molecular mass compounds (El-Aneed et al., 2009).

Ionization method	Analytes	Sample introduction	Mass range	Type of ionization
FAB	Organometallic compounds	Direct injection, LC	<5000 Da	Soft
MALDI	Biomolecules	Sample co-crystallized with a matrix	500-500 000 Da	Very soft. Generates mainly single charged ions
ESI	Organic and inorganic compounds	Direct injection, LC	Large range	Softer than MALDI. Generates multiple charged ions
DESI	Small non-polar and large polar molecules (peptides and proteins)	Analysis of a surface	Large range	Generates single or multiple charged molecular ions from small or large analytes
DART	Low molecular mass compounds	Analysis of a surface	Less broad than DESI	Simple mass spectra (molecular ion)

**Table 1.** Characteristics of the most used ionization sources. FAB: Fast Atomic Bombardment; MALDI: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization; ESI: Electrospray Ionization; DESI: Desorption Electrospray Ionization ; DART: Direct Analysis in Real Time

In MALDI, ions are produced by pulsed-laser irradiation (e.g. nitrogen lasers) of the sample co-crystallized with an organic matrix (e.g. gentisic, sinapic or ferulic acid) and operating in the vacuum or more recently, at atmospheric pressure. MALDI ionization uses a low amount of sample but low molecular mass molecules (below 500 Da) are difficult to analyse, due to strong interferences of the organic matrix ions.

The development of other soft ionization techniques has become crucial to the analysis of biomolecules dissolved in a mixture of water and a volatile organic solvent (e.g. methanol, acetonitrile). Techniques as ESI and MALDI make MS methodologies versatile as both techniques accomplish the conversion into gas-phase ions of non-volatile and thermally labile large molecules, allowing the study of biological compounds. Both techniques produce protonated peptide and protein ions, deprotonated deoxyribonucleic acids (DNA) and ribonucleic acids (RNA). Some reviews have been published on the covalent and non-covalent interactions between drug molecules with DNA and RNA, protein and enzyme targets for drug action and toxicity (Feng, 2004). When using ESI, proteins are ionized as they have several sites of protonation or deprotonation, and this multiple charging enables mass spectrometers with limited  $m/z$  ranges to analyse higher molecular mass molecules. However, ion suppression may occur when solutions contain high concentrations of salt, or when the target analytes are present in low concentration in matrices with high content of other analytes. Strategies based on the type of analyte, ionization reaction, ionization efficiency, analyte solution composition and pH, have been described for producing positive or negative ion modes when operating with an ESI source (Feng, 2004). APCI, is less susceptible to matrix interferences from salts, and is used for monitoring weakly polar compounds. However, labile

compounds can be thermally decomposed, and due to its high sensitivity, the solvents used with this technique must have higher purity.

DART and DESI are well established open-air ionization techniques, as no sample preparation is required, making these techniques suitable for screening a large number of samples (Fernández et al., 2006). The DART ion source produces a heated stream of protonated reactant ions and the analytes in the sample are ionized, producing protonated molecules  $[M+H]^+$  or deprotonated molecules  $[M-H]^-$  in the open air of the laboratory environment, making possible the analysis of organic compounds directly, in real time, without time-consuming analytical protocols and destruction of the sample. The method may detect concentrations of analytes as low as femtomole (Arnaud, 2007). Due to these characteristics, DART has become an ionization method useful for rapid screening of pharmaceutical products. In DESI analysis, a high-speed charged liquid spray is directed to the sample (Takats et al., 2005). The DESI spray dissolves the material from the sample and the charged droplets are sampled downstream by a mass spectrometer. Desolvation and evaporation from these droplets creates ions that will generate a mass spectrum of the sample components.

Following the ionization process, the selected ions are extracted, accelerated, and analyzed. A mass analyser is characterized by its mass range limit, analysis speed, transmission, mass accuracy and resolution, expressed as full width at half maximum (FWHM). The most used analysers and their characteristics are summarized in Table 2.

Quadrupoles are widely used mass analysers, where ions are separated according to the stability of their trajectories in the oscillating electric fields applied between the four parallel rods. The QTOF, a hybrid quadrupole time of flight mass spectrometer, is a high-resolution mass spectrometer with MS/MS capability, and has been often used in drug studies (Nyunt et al., 2005). FT-ICR is also a high resolution and high mass accuracy analyser that enables the study of the binding of ligands (drugs) to RNA targets (Hofstadler et al., 1999; Masselon et al., 2000). The Orbitrap mass analyzer employs electrostatic trapping and it bears similarities to FT-ICR as both belong to the same Fourier Transform MS (FTMS) family of instruments. Orbitrap mass spectrometry is expected to provide maximum resolving powers of 100,000–200,000. A modified Orbitrap instrument has shown that this technology is capable of a resolution of 1,000,000 for  $m/z < 300$ –400, which makes it compatible to be used with chromatographic separation techniques (Denisov et al., 2012).

Tandem mass spectrometry ( $MS^n$ ) development was crucial for the structural analysis of compounds. In tandem experiments, a molecular ion is selectively isolated and fragmented in a controlled environment. With this type of analysers, it is possible to perform different types of experiments (e.g. parent scan, daughter scan, neutral loss) and data obtained, will allow to identify or quantify the analytes, even in complex matrices (e.g. natural product extracts and biological fluids). Multiple Reaction Monitoring (MRM), has become an important tool, used for quantification purposes, allowing an increment of methods specificity and sensitivity.

Finally the signal obtained in the detector will produce a mass spectrum, the x-coordinate represents  $m/z$  values and the y-axis indicates total ion counts.

	Quadrupole	Ion Trap	Time-of-flight	Time-of-flight reflectron	Magnetic sector	Fourier Transform ion cyclotron resonance	Fourier Transform Orbitrap
Symbol	Q	IT	TOF	TOF	B	FT-ICR	FT-OT
Principle of separation	$m/z$ (trajectory stability)	$m/z$ (resonance frequency)	Velocity (flight time)	Velocity (flight time)	Momentum	$m/z$ (resonance frequency)	$m/z$ (resonance frequency)
Mass limit (Th)	4 000	6 000	>1 000 000	4 000	20 000	30 000	50 000
Resolution FWHM ( $m/z$ 1000)	2 000	4 000	5 000	20 000	100 000	500 000	100 000
Accuracy (ppm)	100	100	200	10	<10	<5	<5
Ion sampling	continuous	pulsed	pulsed	pulsed	continuous	pulsed	pulsed
Pressure (Torr)	$10^{-5}$	$10^{-3}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-10}$	$10^{-10}$
Tandem mass spectrometry	MS/MS				MS/MS		
	Fragments	MS <sup>n</sup>		MS/MS	Fragments	MS <sup>n</sup>	
	Precursors	Fragments	-----	Fragments	Precursors	Fragments	-----
	Neutral loss	Low-energy collision		Low-energy collision	Neutral loss	Low-energy collision	
	Low-energy collision			High-energy collision	High-energy collision		

**Table 2.** Comparison of mass analysers (adapted from Hoffmann & Stroobant, 2002)

Liquid chromatography coupled to mass spectrometry (Triple Quadrupole TQ, QTOF, Linear ionTrap and Linear QTRAP analyzers) is today a well established methodology used due to its high sensitivity, speed, selectivity, versatility and ease of automation. Recently the advantages of using mass spectrometry in comprehensive liquid chromatography (LC X LC system) have been discussed and different applications have been described for pharmaceutical compounds (Donato et al., 2012).

### 3. An overview of malaria

Malaria is caused by *Plasmodium* parasites, which are transmitted through the bite of an infected female *Anopheles* mosquito, and remains one of the major infectious disease in man.

Five species from the genus *Plasmodium* namely: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, and *P. knowlesi* cause infection in humans. Of these, *P. falciparum* and *P. vivax* account for more than 95% of malaria cases in the world, with *P. falciparum*, being responsible for most of the deaths caused by malaria every year. The species of human malaria differ in the periodicity of their

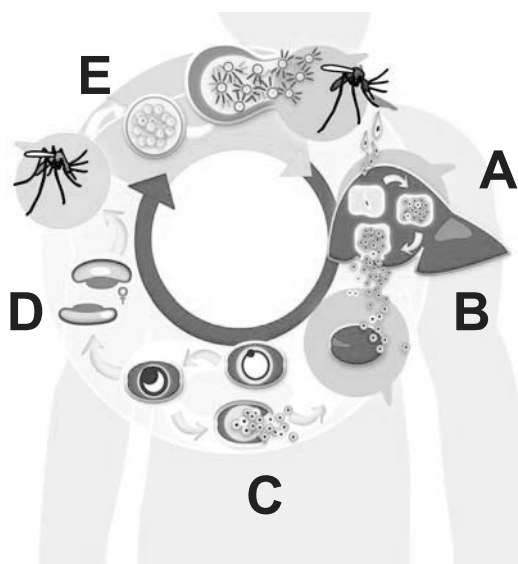
life cycle, as well as in the outcomes of the disease. Generally clinical manifestations can include fever, chills, prostration and anemia. Severe disease can include delirium, metabolic acidosis, cerebral malaria and multi-organ system failure, coma and death may ensue. (Kantele & Jokiranta, 2011)

The World Health Organization (WHO) estimated 225 million cases of malaria and about 800,000 deaths worldwide in 2010 (WHO, 2010). Due to the rapid evolution and spread of multi-resistant parasites to the current antimalarial drugs, both, chemotherapy and prophylaxis are at risk of impairment. Malaria is most prevalent in developing countries of tropical areas such as sub-Saharan Africa, East Asia and South America (Rodrigues et al., 2010; Eisenstein, 2012).

### 3.1. Life cycle of the malaria parasite

The malaria parasite exhibits a complex life cycle (Fig. 2) involving an insect vector (mosquito) and a vertebrate host (human). It includes an asexual cycle in humans, encompassing an asymptomatic liver-stage, a symptomatic blood-stage and a sexual cycle in a mosquito.

The liver or hepatic stage (A) is initiated when sporozoites injected through the bite of a mosquito travel to the liver and infect hepatocytes, where a clinically silent asexual multiplication takes place, generating thousands of merozoites. The release of merozoites into the bloodstream (B) marks the beginning of the erythrocytic stage of infection (C), during which parasites infect red blood cells, undergo repeated asexual replication cycles, and give rise to clinical illness. Some merozoites differentiate into gametocytes (D) that can be taken up by the mosquito during a posterior blood meal. Within the mosquito, gametocytes undergo a sexual development to form sporozoites that migrate to the salivary glands and can infect another host through another bite (E).



**Figure 2.** *Plasmodium* life cycle



### 3.2. Agents with antimalarial activity

The public health problem of malaria has been addressed by different approaches (Biot et al., 2012):

- use of insecticides to control the mosquito vector, but mosquitoes are developing resistance to insecticides;
- vaccines, but in spite of all the efforts there is yet not available a vaccine that effectively targets the parasite;
- chemotherapy to control malaria has relied mainly on a restricted number of chemically related drugs belonging to either the quinoline or the antifolate groups.

Increasing resistance of *P. falciparum* to the commonly used drugs is recognized as one of the major problems in eradication of the disease. The severe malaria situation underscores the continuing need of research for new classes of antimalarial agents with new mechanisms of action or re-utilization of the existing drugs with new types of therapies. The existing drug armamentarium is insufficient to answer the call for malaria eradication. The first line of treatment for malaria currently relies on a single class, the artemisinins. To overcome this problem scientists are exploring many approaches, targeting different stages of the parasite life cycle, to find agents that will prevent, cure or eliminate malaria. (Hobbs, C. & Duffy, P., 2011)

Many antimalarial agents contain a 4-aminoquinoline, 8-aminoquinoline or quinolone methanol scaffolds (Rosenthal, 2001). Chloroquine and amodiaquine are 4-aminoquinolines used to treat and prevent malaria, while primaquine is the single 8-aminoquinoline clinically approved to treat relapsing malaria caused by *P. vivax*. Mefloquine (Fig. 3) is a quinoline methanol antimalarial structurally similar to quinine, the first pure substance used to treat malaria and extracted from the bark of the cinchona tree. Other relevant classes of antimalarial agents include the antifolates (e.g. pyrimethamine and proguanil), phenanthrene methanols (e.g. halofantrine), and naphthoquinones (e.g. atovaquone). More recently, artemisinin (Fig. 3), a sesquiterpene lactone isolated from the *Artemisia annua* chinese herb, and its analogues were a major breakthrough in malaria chemotherapy because they produce a very rapid therapeutic response, particularly against multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria.

With exception of primaquine, (Vale et al., 2009) most available antimalarials are active against the blood stage of the disease. However to achieve the eradication goal, new compounds with new modes of action are needed to block parasite transmission and eliminate the asymptomatic and latent hepatic forms. (Rodrigues et al., 2012) A strategy used to address this major goal is to combine two chemotypes - each one targeting a specific stage of the parasite's life cycle in a single chemical entity, to develop effective hybrid antimalarials capable of killing both the blood and liver-stage parasites with identical efficacy. (Capela et al., 2011)

## 4. Study of antimalarials agents by mass spectrometry

Structural and stability information is fundamental for any drug study, including antimalarials. In fig. 3 are presented currently available antimalarial drugs. Due to the rapid emergence and spread of resistant parasites to well-established antimalarial drugs, there is an urgent need for novel drugs. Studies performed on new antimalarial compounds using mass spectrometry are scarce but are useful for the elucidation of structures, also for prediction of compound stability and properties, isomer characterization, and detection of counterfeit products. Furthermore, studies using this technique coupled to chromatographic methods have been conducted for the evaluation of pharmacokinetics, metabolite identification, and detection of impurities.

### 4.1. Structural elucidation

One of the main applications of mass spectrometry is the structural elucidation of molecules. Based on the molecular ion peaks and their fragmentation patterns, the structure of compounds can then be proposed.

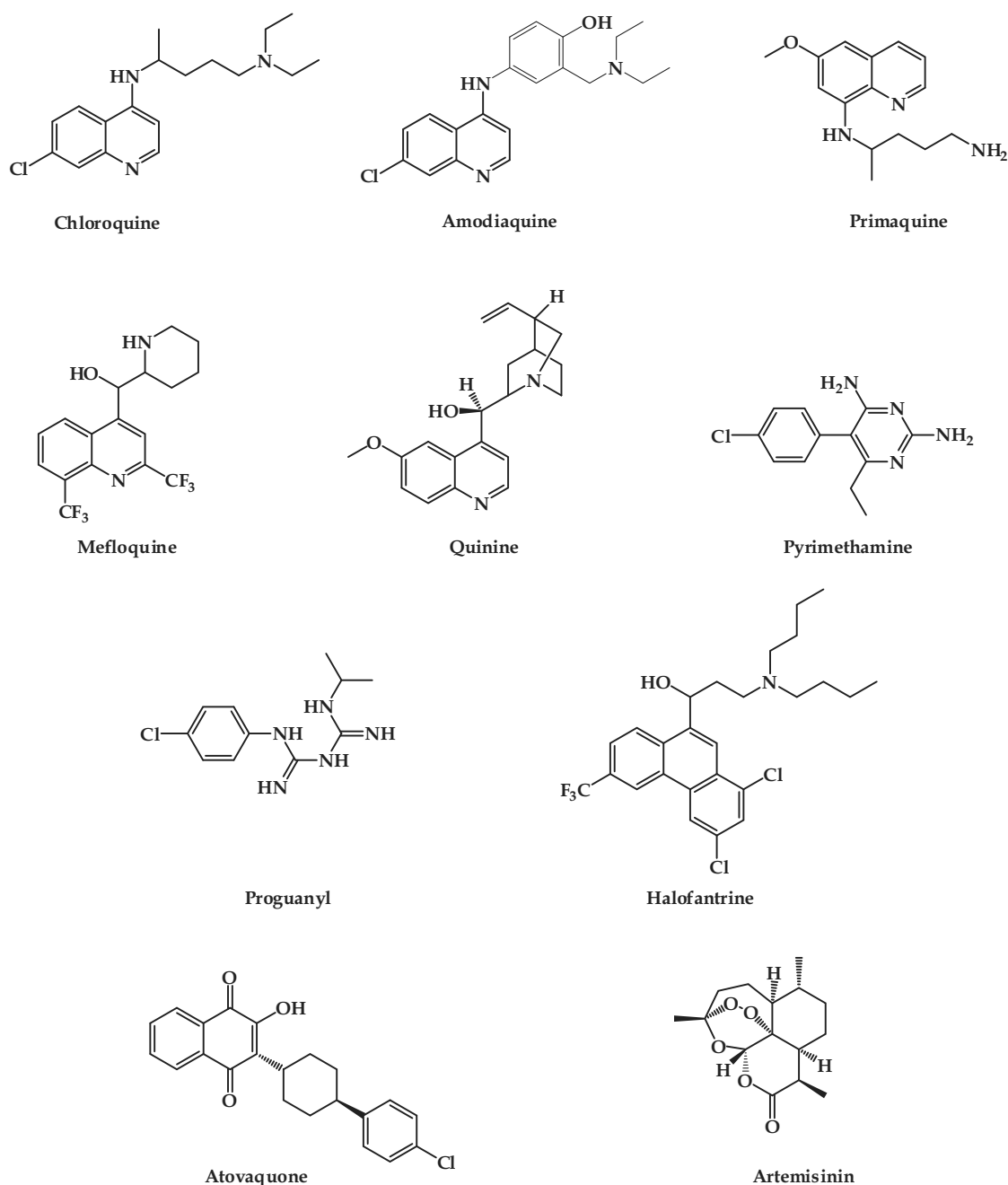
Among the different equipments that can be used for these purposes, FAB ion sources are frequently described. Applications can be found in the study of the oxidation products of primaquine, 5,5-di-[6-methoxy-8-(4-amino-1-butyl amino)] quinoline (PI), 6-methoxy-5,8-di-[4-amino-1-methyl butyl amino] quinoline (PII) and 5,5-di-[7-hydroxy-6-methoxy-8(4-amino-1-methyl butylamino)] quinoline (PIII) (Fig. 4) (Sinha & Dua 2004). The mass spectrum of PI with molecular formula  $C_{30}H_{40}N_6O_2$  presents the molecular ion at  $m/z$  517 confirming the molecular mass of the compound, and a fragment at  $m/z$  500 is detected due to the presence of a terminal amino group at position 4'.

An LC-MS/MS method was developed for the analysis of bulaquine (BQ) 3-[1-[4-[(6-methoxy-8-quinolinylamino) pentylamino] ethylidene]dihydro-2 (3H)-furanone (Fig. 5) and its metabolite primaquine in monkey plasma. Protonated species at  $m/z$  370 and 260 were detected for bulaquine and primaquine, respectively. MS/MS conditions were optimized generating product ions through fragmentation of the molecular ions. Based on the fragmentation spectra obtained from  $[M+H]^+$  under the established analytical conditions, a fragmentation pattern was presented for these compounds. This type of study is important to establish analytical conditions for the quantification of drugs and their metabolites in biological fluids. (Nitin et al., 2003)

An ESI-Ion trap mass spectrometer was used to perform  $MS^n$  analyses, in the study of imidazolidin-4-one peptidomimetic derivatives of primaquine. (Vale et al., 2008a)

### 4.2. Pharmacokinetic studies

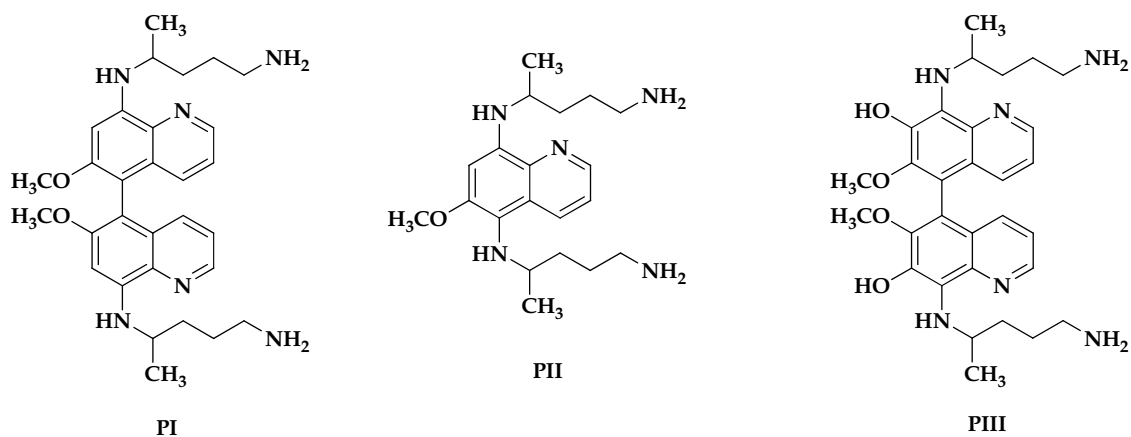
Pharmacokinetic (PK) studies provide a mathematical basis to assess the time course of drug in the body. It enables to quantify absorption, distribution, metabolism and excretion of the drug and their metabolites. The primary requirement to undertake a PK study, is to have an



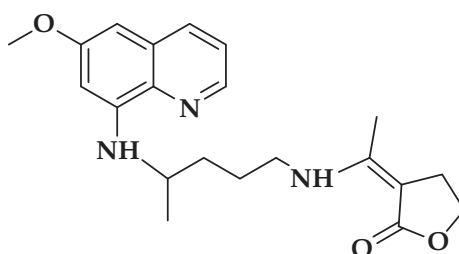
**Figure 3.** Currently available antimalarial drugs

analytical method which is reliable, reproducible, sensitive, selective, and if possible, compatible with high-throughput pharmacokinetic approaches.

Drug efficacy requires adequate drug concentration at the site of action. Monitoring drugs and their metabolites in biological samples (*in vivo* studies), is fundamental in order to control the intake of the antimalarials by the infected populations. Mass spectrometry has been successfully used for this purposes, coupled with liquid chromatography, and analytical methods



**Figure 4.** The oxidative antimalarial primaquine analogous (PI, PII and PIII)



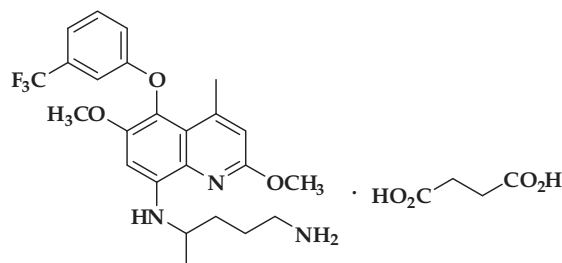
**Figure 5.** Bulaquine

have been optimized and validated for quantification of different drugs and metabolites in biological fluids.

A LC-MS/MS method was used to study 14 antimalarial drugs, which are the components of the current first-line combination treatments for malaria (artemether, artesunate, dihydroartemisinin, amodiaquine, N-desethyl-amodiaquine, lumefantrine, desbutyl-lumefantrine, piperaquine, pyronaridine, mefloquine, chloroquine, quinine, pyrimethamine and sulfadoxine). The best conditions for mass spectrometry analysis were optimized (Hodel et al., 2009) and the method developed was implemented, and used to analyse samples from an *in vivo* study with 125 Southeast Asian patients from two regions of Cambodia: one region with a high level of antimalarial drug resistance and another region with moderate levels of drug resistance (Hodel et al., 2010). The 14 antimalarial drugs were measured in plasma samples from the patients, and results showed that for half of them, an antimalarial drug was detected namely mefloquine, piperaquine, chloroquine or quinine. However all patients reported either not having taken any antimalarial before or not knowing to have taken. These results are important, as they show that it is urgent to ensure appropriate use of antimalarials among the populations.

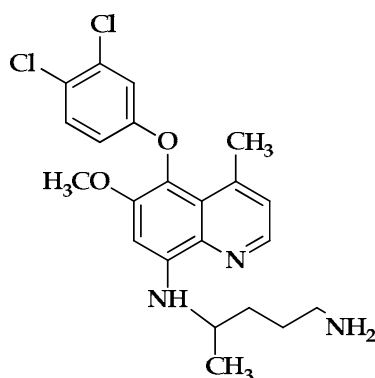
Tafenoquine (8-[(4-amino-1-methylbutyl)amino]-2,6-dimethoxy-4-methyl-5-(3-trifluoromethyl-phenoxy) quinoline succinate) (Fig. 6) was measured in human plasma from patients and

healthy volunteers during a clinical efficacy trial, using a LC-MS/MS equipment. (Doyle et al., 2002)



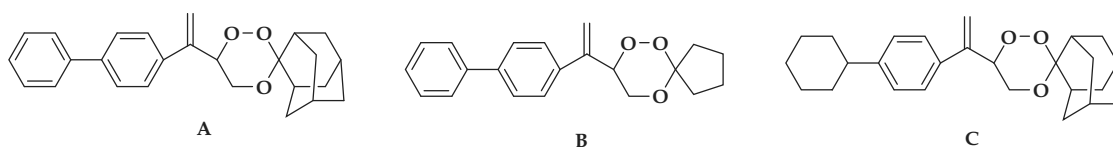
**Figure 6.** Tafenoquine

For NPC1161 (Fig. 7), an 8-aminoquinoline analog (8-[(4-amino-1-methylbutyl)amino]-5-[3,4-dichloro-phenoxy]-4-methyl-quinoline) and their metabolites, a LC-MS method using an electrospray ionization source and a TOF analyzer, was implemented.

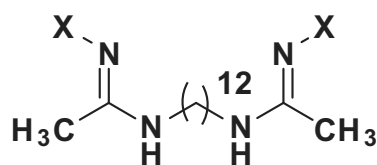


**Figure 7.** NPC1161, an 8-aminoquinoline analog

Using mass spectrometry other antimalarial molecules as  $\alpha$ -/ $\beta$ -diastereomers of arteether (AE), sulphadoxine (SDX) and pyrimethamine (PYR) (Sabarinath et al., 2006) and three novel trioxane antimalarials (Fig. 8) (Singh et al., 2008) were determined in rat plasma. A *N*-alkylamidine compound, M64, and its corresponding bioprecursors were measured in human and rat plasma (Margout et al., 2011) (Fig. 9). Artemisinin class compounds and its active *in-vivo* metabolites were analysed in monkey plasma (Singh et al., 2009).



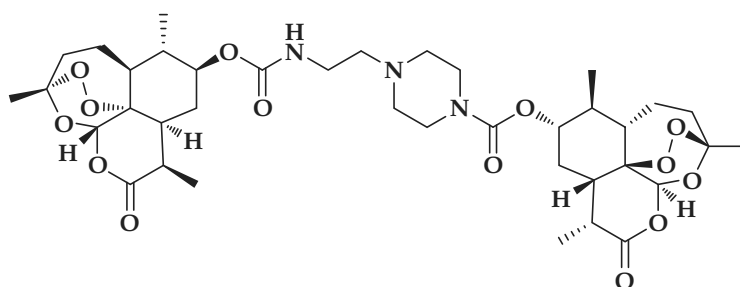
**Figure 8.** Chemical structures of three novel trioxane antimalarials



M64, X=H; M64AH, X=OH; M64-S-Me, X=OSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>

**Figure 9.** Chemical structures of compound, M64, and its corresponding bioprecursors

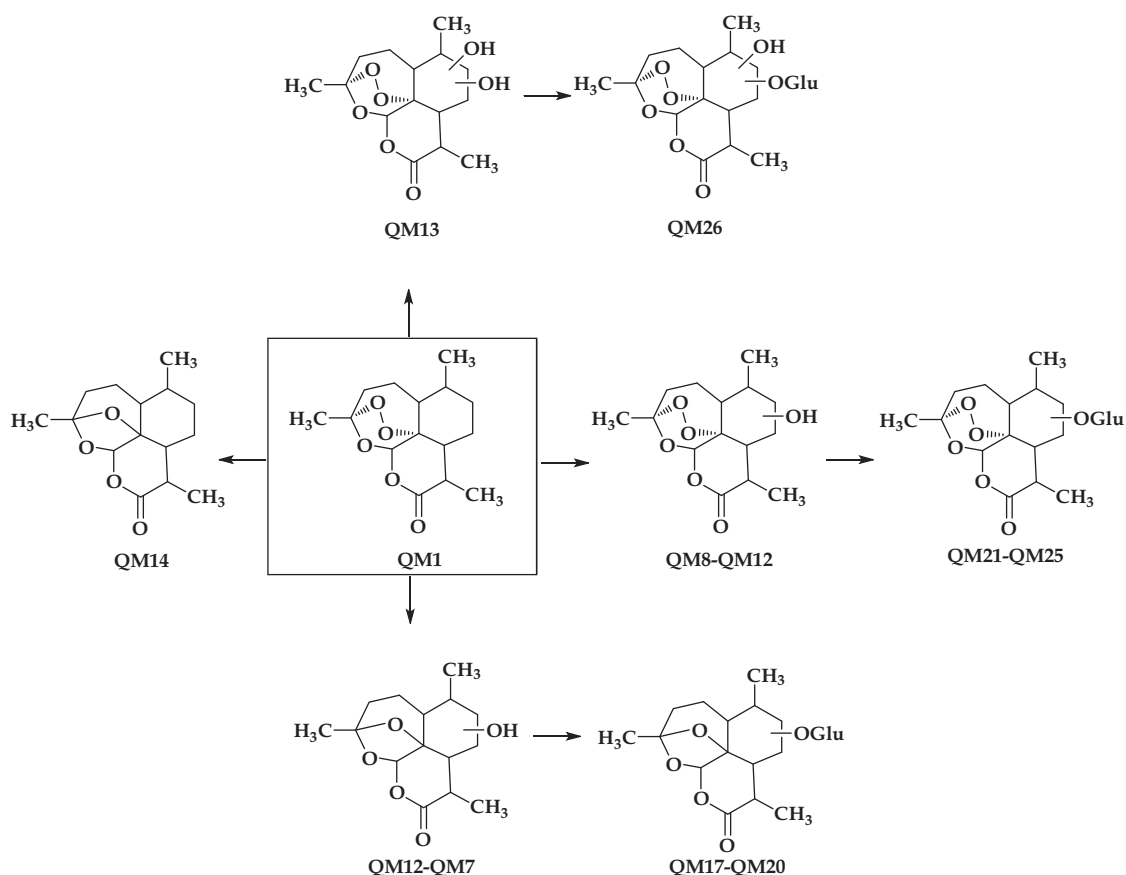
A method was also developed and validated according to FDA guidelines for simultaneous determination of two mono-thiazolium compounds in plasma, whole blood and red blood cells from human and rat (Taudon et al., 2008). More recently a rapid (3 min analysis) and sensitive UPLC-MS/MS method using a triple quadrupole tandem mass spectrometer in positive ESI mode, has been implemented for the analysis of ARB-89 (7 $\alpha$ -hydroxy artemisinin carbamate) (Fig. 10) in rat serum, for pharmacokinetics studies, (Pabbisetty et al., 2012).



**Figure 10.** ARB-89 (7 $\alpha$ -hydroxy artemisinin carbamate)

Mass spectrometry has proven to be particularly useful in identifying complex metabolites as those arising from phase I (e.g. those involving cytochrome P450 monooxygenases) and phase II (e.g. conjugation with glucuronic acid, sulfonates, glutathione or amino acids) reactions. In a study published by Liu et al., 2011, metabolites of artemisinin, also known as Qing-hao-su (QHS), and its active derivative dihydroartemisinin (DHA) were identified in *in vitro* and *in vivo* biological samples using a LTQ-Orbitrap mass spectrometer in tandem with H/D exchange. The authors were able to show that artemisinin drugs mainly undergo hydroxylation and loss of oxygen in the phase I metabolic pathway and can form glucuronides in the phase II processes, as shown in Fig. 11. Based on MS data it was proposed a metabolic pathway for these metabolites.

Piperaquine was synthesized for the first time about 50 years ago, but seems to be a suitable partner drug in artemisinin-based combination treatments. In a paper published by Tarning et al., 2006, the main metabolites of piperaquine were characterized in a 16-h human urine, after a single p.o. administration of a fixed combination of dihydroartemisinin-piperaquine, with a fatty meal. A LC method in tandem with a QTRAP system was used to analyse piperaquine and its metabolites and a FT-ICR/MS equipment was used to obtain mass spectra



**Figure 11.** Proposed metabolic pathways for QHS *in vitro* and *in vivo* (Liu et al., 2011)

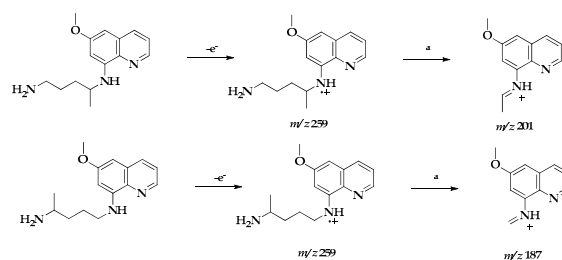
of the five metabolites of piperazine in urine samples. Two of the metabolites (a carboxylic and a mono N-oxidated piperazine metabolite) were considered as the most relevant as they were detected in the serum/plasma samples collected up to 93 days, and also in urine 123 days after administration of the drug. Other two monohydroxylated metabolites and a di-N-oxidized metabolite were also detected in urine samples.

#### 4.3. Detection of impurities

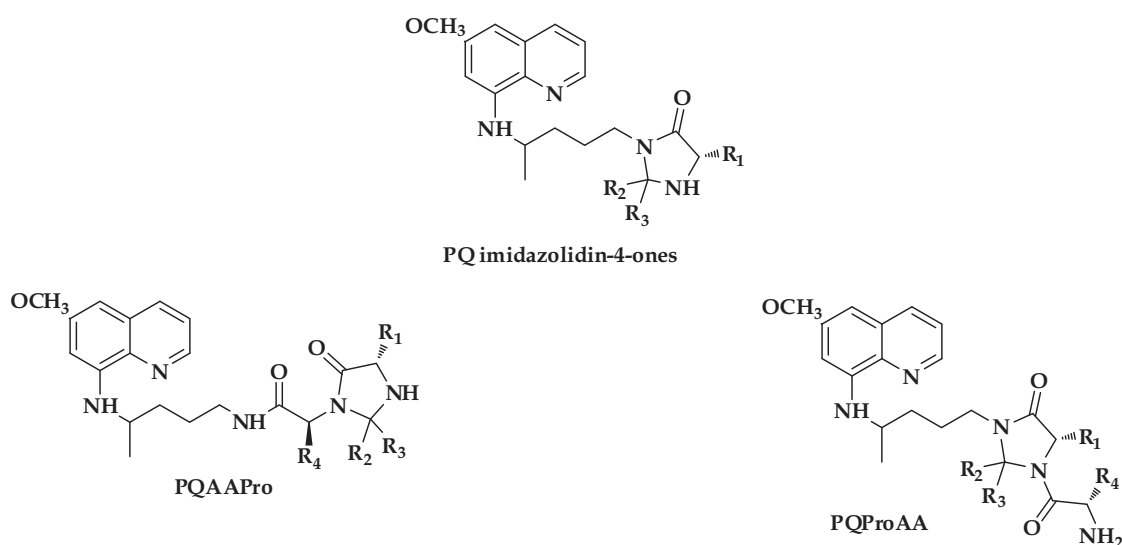
A major impurity (8-(4-amino-4-methylbutylamino)-6 methoxyquinoline) associated with primaquine drug samples (Fig.12), obtained from European Pharmacopoeia and other commercial sources, was detected by gas chromatography-electron impact-mass spectrometry (GC-EI-MS) (Dongre et al., 2005).

#### 4.4. Chemical stability studies

Mass spectrometry can also be conducted in order to contribute to study the properties of compounds, through knowledge of their stability and fragmentation mechanisms, under the gas-phase conditions of a mass spectrometer. This type of studies can have, in the future, important implications in drug analysis and development.



**Figure 12.** Fragmentation pattern of primaquine and the corresponding impurity



**Figure 13.** PQ imidazolidin-4-ones, PQAAPro and PQProAA mimetic derivatives of primaquine

Studies on primaquine derived imidazolidin-4-ones using an ESI-ion trap mass spectrometer have allowed to find a correlation between the stability of the ions in the nozzle-skimmer region during the CID (Collision Induced Dissociation) analyses and reactivity in both isotonic buffer and human plasma (Vale et al., 2008). The same authors (Vale et al., 2008a) studied imidazolidin-4-one peptidomimetic derivatives of primaquine, PQAAPro and PQProA (Fig. 13) and they also found the parallelism between compound reactivity to hydrolysis and stability during CID analysis. Using CID and MS/MS experiments to study the peptidomimetic imidazolidin-4-one derivatives of primaquine, it was possible to conclude that CID spectra reflected the reactivity of compounds under physiological conditions, and the relative abundances of MS/MS generated fragments were correlated with the Charton steric parameters associated to amino acid side chain in the molecule (Vale et al., 2009).

From the results obtained, ESI-MS proved to be a reliable tool for stability prediction of compounds towards hydrolysis at physiological pH and temperature although the mechanisms in water and in the gas-phase are not comparable. This type of studies were, for the first time, approached by these authors.



#### 4.5. Detection of counterfeit drugs

The quality of commercially available drugs varies among countries. The WHO/International Medical Products Anti-Counterfeiting Taskforce estimates that in some less developed countries, the counterfeit drugs are up to 50% of the total drugs supplied to the populations (Hall et al., 2006). Due to the lack of regulations and poor quality control practices, the amount of the active ingredient may be incorrect, as a result of chemical degradation that occurs due to poor storage conditions, especially in warm and humid tropical environments. In some cases, expired drugs are repackaged with new expiration dates and put in the market. Also some drugs can be contaminated or replaced by other substances and people consume sawdust, paint and other toxic or inert substances (Kaur et al., 2009).

The report published by WHO in 2011, about the quality of antimalarial drugs in 6 countries of sub-Saharan Africa (Cameroon, Ethiopia, Ghana, Kenya, Nigeria and the United Republic of Tanzania) resumes the results obtained from the analysis of 935 samples and gives an idea about the quality and counterfeits that more often occur.

As an incorrect intake can result in a low bioavailability of the drug in the individual, leading to drug-resistance strains, provoking a therapeutic failure, reliable methods of analysis must be available to determine the quality of antimalarials commercialized, and LC coupled with mass spectrometry can be used. However this technique is expensive, requires training, technological support, and sample preparation. Actually, DART (Fernández et al., 2006) and DESI (Haiss et al., 2007) methodologies are often used, as they produce results rapidly, because they do not require sample preparation. Results obtained from a DESI MS method were used to validate Fourier-transform infrared imaging for characterization of counterfeit antimalarial pharmaceutical in tablets (Ricci et al., 2007). A DESI MS method was also applied for the quantitative screening of counterfeit antimalarial tablets containing artesunate (Nyadong et al., 2008), and more recently DESI and DART methods were used to validate results from the application of FT-Raman spectroscopy for *in situ* screening for potentially counterfeit artesunate antimalarial tablets (Ricci et al., 2008).

#### 4.6. Rapid diagnosis of malaria

The rapid diagnosis of malaria infection can also be performed by mass spectrometry. Hemozoin, the malaria pigment, can be detected by laser desorption mass spectrometry (LDMS) in human blood. (Scholl et al., 2004) Detection of malaria in 45 asymptomatic pregnant Zambian women was performed by this technique. Detection of *Plasmodium falciparum* malaria during pregnancy is complicated by sequestration of parasites in the placenta reducing peripheral blood microscopic detection. LDMS was able to detect <10 parasites/uL cultured in human blood and provided a more rapid mean of screening for infection than the technique used currently for this purpose, light microscopy (Nyunt et al., 2005).

### 5. Conclusions

The information obtained from the use of mass spectrometry in the study of antimalarials agents is important, in order to understand all the mechanisms of the illness, malaria, and the

way the different drugs interact in the human organism. Due to its characteristics (sensitivity, speed, possibility to be automated, possibility to combine with separation techniques) and diversity of equipments available, mass spectrometry can be used in the structural identification of new molecules, in the study of many phases of drug discovery, for assessment of compound stability, pharmacokinetic studies monitoring the concentrations of antimalarials and metabolites in biological matrices, the studies of cell permeability and plasma protein binding, and finally, in the quality control of commercial drugs.

The use of mass spectrometry to predict stability of compounds in physiological conditions may become an important tool.

## Author details

Ana Raquel Siteo<sup>1</sup>, Francisca Lopes<sup>1</sup>, Rui Moreira<sup>1</sup>, Ana Coelho<sup>2</sup> and Maria Rosário Bronze<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Research Institute for Medicines and Pharmaceutical Sciences (iMed.UL), Faculty of Pharmacy, University of Lisbon, Portugal

<sup>2</sup> Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Oeiras, Portugal

## References

- [1] Arnaud, C. H. (2007). Taking mass spec into the open: Open-air ionization methods minimize sample pre and widen range of mass spectrometry applications. *Chemical & Engineering News*, 85(41), 13-18.
- [2] Biot, C, Castro, W, & Navarro, M. (2012). The therapeutic potential of metal-based antimalarial agents: Implications for the mechanism of action. *Dalton Transactions*, 41(21), 6335-6349.
- [3] Capela, R, Cabal, G. G, Rosenthal, P. J, Gut, J, Mota, M. M, Moreira, R, Lopes, F, & Prudêncio, M. (2011). Design and Evaluation of Primaquine-Artemisinin Hybrids as a Multistage Antimalarial Strategy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(10), 4698-4706.
- [4] Denisov, E. Damoc; Lange, O. & Makarov, A. ((2012). Orbitrap mass spectrometry with resolving powers above 1,000,000. *International Journal of Mass Spectrometry* 325-327(0), 80-85.
- [5] Donato, P. Cacciola; Tranchida, F.P.; Dugo, P. & Mondello, L. ((2012). Mass spectrometry detection in comprehensive liquid chromatography: basic concepts, instrumental aspects, applications and trends. *Mass Spectrometry Reviews*, 31(5), 523-559.

- [6] Dongre, V. G, Karmuse, P. P, Nimbalkar, M. M, Singh, D, & Kumar, A. (2005). Application of GC-EI-MS for the identification and investigation of positional isomer in primaquine, an antimalarial drug. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 39(1-2), 111-116.
- [7] Doyle, E, Fowles, S. E, Summerfield, S, & White, T. J. (2002). Rapid determination of tafenoquine in small volume human plasma samples by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies Biomedical Life Sciences* , 769(1), 127-132.
- [8] Eisenstein, M. (2012). Drug development holding Holding out for reinforcements. *Nature* 484(7395): S18., 16.
- [9] El-Aneed, A, Cohen, A, & Banoub, J. (2009). Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. *Applied Spectroscopy Reviews* , 44(3), 210-230.
- [10] Feng, W. Y. (2004). Mass spectrometry in drug discovery: a current review. *Current Drug Discovery Technologies* , 1(4), 295-312.
- [11] Fernández, F. M, Cody, R. B, Green, M. D, Hampton, C. Y, McGready, R, Sengaloun-deth, S, White, N. J, & Newton, P. N. (2006). Characterization of Solid Counterfeit Drug Samples by Desorption Electrospray Ionization and Direct-analysis-in-real-time Coupled to Time-of-flight Mass Spectrometry. *ChemMedChem* , 1(7), 702-705.
- [12] Glish, G. L, & Vachet, R. W. (2003). The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nature Reviews Drug Discovery* , 2(2), 140-150.
- [13] Haiss, W, Thanh, N. T, Aveyard, J, & Fernig, D. G. (2007). Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-vis spectra. *Analytical Chemistry* , 79(11), 4215-4221.
- [14] Hall, K. A, & Newton, P. N. Green, M.D; De Veij, M; Vandenabeele, P.; Pizzanelli, D.; Mayxay, M.; Dondorp, A. & Fernandez, F.M. ((2006). Characterization of counterfeit artesunate antimalarial tablets from southeast Asia. *The American Journal Tropical Medicine and Hygiene* , 75(5), 804-811.
- [15] Hobbs, C, & Duffy, P. (2011). Drugs for malaria: something old, something new, something borrowed. *F1000 Biology Reports*, 3(24), 1-9.
- [16] Hodel, E. M, Genton, B, Zanolari, B, Mercier, T, Duong, S, Beck, H. P, Olliaro, P, Decosterd, L. A, & Arieu, F. (2010). Residual antimalarial concentrations before treatment in patients with malaria from Cambodia: indication of drug pressure. *Journal of Infectious Diseases* , 202(7), 1088-1094.
- [17] Hodel, E. M, Zanolari, B, Mercier, T, Biollaz, J, Keiser, J, Olliaro, P, Genton, B, & Decosterd, L. A. LC-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of 14 antimalarial drugs and their metabolites in human plasma. *Journal of Chromatography B* , 877(10), 867-886.

- [18] Hoffmann, E, & Stroobant, V. (2002). *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, John Wiley & Sons, 3rd Edition, 978-0-47003-310-4HB), Great Britain.
- [19] Hofstadler, S. A, Sannes-lowery, K. A, Crooke, S. T, Ecker, D. J, Sasmor, H, Manalili, S, & Griffey, R. H. (1999). Multiplexed screening of neutral mass-tagged RNA targets against ligand libraries with electrospray ionization FTICR MS: a paradigm for high-throughput affinity screening. *Analytical Chemistry* , 71(16), 3436-3440.
- [20] Kantele, A, & Jokiranta, T. S. (2011). Review of Cases With the Emerging Fifth Human Malaria Parasite, *Plasmodium knowlesi*. *Clinical Infectious Diseases* , 52(11), 1356-1362.
- [21] Kaur, H, Green, M. D, Hostetler, M. D, & Fernández, F. M. Paul N Newton ((2009). Antimalarial drug quality: methods to detect suspect drugs. *Therapy* , 7(1), 49-57.
- [22] Liu, T, Du, F, Wan, Y, Zhu, F, & Xing, J. (2011). Rapid identification of phase I and II metabolites of artemisinin antimalarials using LTQ-Orbitrap hybrid mass spectrometer in combination with online hydrogen/deuterium exchange technique. *Journal of Mass Spectrometry* , 46(8), 725-733.
- [23] Margout, D, Gattacceca, F, Moarbess, G, & Wein, S. Tran van Ba, C.; Le Pape, S.; Berger, O.; Escale, R.; Vial, H. J. & Bressolle, F. M. ((2011). Pharmacokinetic properties and metabolism of a new potent antimalarial N-alkylamidine compound, M64, and its corresponding bioprecursors. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 42(1-2), 81-90.
- [24] Masselon, C, Anderson, G, Harkewicz, R, Bruce, J. E, Pasa-tolic, L, & Smith, R. D. (2000). Accurate Mass Multiplexed Tandem Mass Spectrometry for High-Throughput Polypeptide Identification from Mixtures. *Analytical Chemistry* , 72(8), 1918-1924.
- [25] Nitin, M, Rajanikanth, M, Lal, J, Madhusudanan, K. P, & Gupta, R. C. (2003). Liquid chromatography-tandem mass spectrometric assay with a novel method of quantitation for the simultaneous determination of bulaquine and its metabolite, primaquine, in monkey plasma. *Journal of Chromatography B* , 793(2), 253-263.
- [26] Nyadong, L, Late, S, Green, M. D, Banga, A, & Fernández, F. M. (2008). Direct Quantitation of Active Ingredients in Solid Artesunate Antimalarials by Noncovalent Complex Forming Reactive Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* , 19(3), 380-388.
- [27] Nyunt, M, Pisciotta, J, Feldman, A. B, Thuma, P, Scholl, P. F, Demirev, P. A, Lin, J. F, Shi, L, Kumar, N, & Sullivan, D. J. (2005). Detection of *Plasmodium falciparum* in pregnancy by laser desorption mass spectrometry. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* , 73(3), 485-490.
- [28] Pabbisetty, D, Illendula, A, Muraleedharan, K. M, Chittiboyina, A. G, Williamson, J. S, Avery, M. A, & Avery, B. A. (2012). Determination of antimalarial compound,

- ARB-89 (7 $\beta$ -hydroxy-artemisinin carbamate) in rat serum by UPLC/MS/MS and its application in pharmacokinetics. *Journal of Chromatography B* 889-890(0), 123-129.
- [29] Ricci, C, Nyadong, L, Fernandez, F. M, Newton, P. N, & Kazarian, S. G. (2007). Combined Fourier-transform infrared imaging and desorption electrospray-ionization linear ion-trap mass spectrometry for analysis of counterfeit antimalarial tablets. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* , 387(2), 551-559.
- [30] Ricci, C, Nyadong, L, Yang, F, Fernandez, F. M, Brown, C. D, Newton, P. N, & Kazarian, S. G. (2008). Assessment of hand-held Raman instrumentation for in situ screening for potentially counterfeit artesunate antimalarial tablets by FT-Raman spectroscopy and direct ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* , 623(2), 178-186.
- [31] Rodrigues, T, Moreira, R, & Lopes, F. (2010). New hope in the fight against malaria? *Future Medicinal Chemistry* , 3(1), 1-3.
- [32] Rodrigues, T, Prudêncio, M, Moreira, R, Mota, M. M, & Lopes, F. (2012). Targeting the liver stage of malaria parasites: a yet unmet goal. *J Med Chem* , 55(3), 995-1012.
- [33] Rosenthal, P. J. (2001). *Antimalarial chemotherapy: mechanisms of action, resistance, and new directions in drug discovery*, Springer-Science+Business Media, LLC, New Jersey.
- [34] Sabarinath, S, Singh, R. P, & Gupta, R. C. (2006). Simultaneous quantification of  $\alpha$ -/ $\beta$ -diastereomers of arteether, sulphadoxine and pyrimethamine: A promising anti-relapse antimalarial therapeutic combination, by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* , 842(1), 36-42.
- [35] Scholl, P. F, Kongkasuriyachai, D, Demirev, P. A, Feldman, A. B, Lin, J. S, Sullivan, D. J, & Kumar, N. (2004). Rapid detection of malaria infection in by laser desorption mass spectrometry. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 71(5), 2004, 546-551.
- [36] Singh, R. P, Sabarinath, S, & Gautam, N. Gupta, R. C & Singh, SK. ((2009). Liquid chromatographic tandem mass spectrometric assay for quantification of 97/78 and its metabolite 97/63: a promising trioxane antimalarial in monkey plasma. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies and Biomedical Life Sciences* , 877(22), 2074-2080.
- [37] Singh, R. P, Sabarinath, S, Singh, S. K, & Gupta, R. C. (2008). A Sensitive and selective liquid chromatographic tandem mass spectrometric assay for simultaneous quantification of novel trioxane antimalarials in different biomatrices using sample-pooling approach for high throughput pharmacokinetic studies. *Journal of Chromatography B*, 864(1-2), 52-60.

- [38] Sinha, S. N. & V. K. Dua (2004). Fast atom bombardment mass spectral analysis of three new oxidative products of primaquine. *International Journal of Mass Spectrometry* , 232(2), 151-163.
- [39] Takats, Z, Wiseman, J. M, et al. (2005). Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology. *Journal of Mass Spectrometry* , 40(10), 1261-1275.
- [40] Tarning, J, Bergqvist, Y, Day, N. P, Bergquist, J, Arvidsson, B, & White, N. J. Ashton, M & Lindegårdh, N. (2006). Characterization of human urinary metabolites of the antimalarial piperaquine. *Drug Metabolism and Disposition* , 34(12), 2011-2019.
- [41] Taudon, N, Margout, D, Calas, M, Kezutyte, T, Vial, H. J, & Bressolle, F. M. (2008). A liquid chromatography-mass spectrometry assay for simultaneous determination of two antimalarial thiazolium compounds in human and rat matrices. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* , 48(3), 1001-1005.
- [42] Vale, N, Matos, J, Moreira, R, & Gomes, P. (2008). Electrospray ionization-ion trap mass spectrometry study of PQAAPro and PQProAA mimetic derivatives of the antimalarial primaquine. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* , 19(10), 1476-1490.
- [43] Vale, N, Moreira, R, & Gomes, P. (2008). Characterization of primaquine imidazolidin-4 ones with antimalarial activity by electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry* 270(1-2), 81-93.
- [44] Vale, N, Matos, J, Moreira, R, & Gomes, P. (2009). Electrospray ionization mass spectrometry as a valuable tool in the characterization of novel primaquine peptidomimetic derivatives. *European Journal of Mass Spectrometry* , 15(5), 627-640.
- [45] Vale, N, Moreira, R, & Gomes, P. (2009). Primaquine revisited six decades after its discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry* , 44(3), 937-953.
- [46] World Health Organization (2010). *World Malaria Report 2010*, WHO Press, Geneva, Switzerland.
- [47] World Health Organization (2011). *Survey of the quality of selected antimalarial medicines circulating in six countries of sub-Saharan Africa, Quality Assurance and Safety: Medicines Essential Medicines and Pharmaceutical Policies*, WHO Press, Geneva, Switzerland.

# Quinolin-4(1*H*)-imines are Potent Antiplasmodial Drugs Targeting the Liver Stage of Malaria

Tiago Rodrigues,<sup>\*,†,‡</sup> Filipa P. da Cruz,<sup>§</sup> Maria J. Lafuente-Monasterio,<sup>||</sup> Daniel Gonçalves,<sup>†</sup> Ana S. Ressurreição,<sup>†</sup> Ana R. Siteo,<sup>†</sup> Maria R. Bronze,<sup>†</sup> Jiri Gut,<sup>⊥</sup> Gisbert Schneider,<sup>‡</sup> Maria M. Mota,<sup>§</sup> Philip J. Rosenthal,<sup>⊥</sup> Miguel Prudêncio,<sup>§</sup> Francisco-Javier Gamo,<sup>||</sup> Francisca Lopes,<sup>†</sup> and Rui Moreira<sup>†</sup>

<sup>†</sup>Research Institute for Medicines and Pharmaceutical Sciences (iMed.UL), Faculty of Pharmacy, University of Lisbon, Avenida Prof. Gama Pinto, 1649-019 Lisbon, Portugal

<sup>‡</sup>ETH Zürich, Institute of Pharmaceutical Sciences, Wolfgang-Pauli-Strasse 10, 8093 Zürich, Switzerland

<sup>§</sup>Unidade de Malária, Instituto de Medicina Molecular, Faculty of Medicine, University of Lisbon, Avenida Prof. Egas Moniz, 1649-028 Lisbon, Portugal

<sup>||</sup>Tres Cantos Medicines Development Campus, Diseases of the Developing World, GlaxoSmithKline, Tres Cantos, 28760 Madrid, Spain

<sup>⊥</sup>Department of Medicine, San Francisco General Hospital, University of California, San Francisco, Box 0811, San Francisco, California, 94143, United States

## Supporting Information

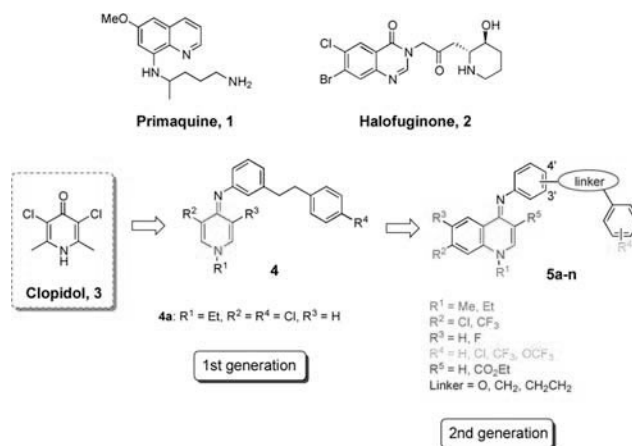
**ABSTRACT:** We present a novel series of quinolin-4(1*H*)-imines as dual-stage antiplasmodials, several-fold more active than primaquine in vitro against *Plasmodium berghei* liver stage. Among those, compounds **5g** and **5k** presented low nanomolar IC<sub>50</sub> values. The compounds are metabolically stable and modulate several drug targets. These results emphasize the value of quinolin-4(1*H*)-imines as a new chemotype and their suitable properties for further drug development.

## INTRODUCTION

Malaria remains a major public health threat worldwide, being responsible for high mortality and morbidity burdens in malaria-endemic countries.<sup>1</sup> Discovery of novel effective and safe antimalarials has been traditionally focused on targeting asexual parasitic stages in host erythrocytes that cause clinical symptoms.<sup>2,3</sup> However, full eradication of the disease requires intervention at the various developmental stages of the parasite within the host as well as in the mosquito vector.<sup>4</sup>

The liver stage of *Plasmodium* spp. infection is a mandatory life cycle step toward the generation of intraerythrocytic forms causing clinical symptoms.<sup>5</sup> Thus, targeting exoerythrocytic forms (EEFs) of the parasite offers clear advantages, as only full blocking of the clinically silent liver stage leads to true causal prophylaxis and consequently arrest of parasitic transmission. In some *Plasmodium* species, such as *Plasmodium ovale* and *Plasmodium vivax*, EEFs may persist in cryptic forms: hypnozoites, which can remain dormant for several years and, upon reactivation, lead to relapses, posing a massive challenge for malaria eradication.<sup>6,7</sup> Despite the benefits of targeting the liver stage of malaria,<sup>8</sup> only in the recent past efforts have been made to discover new drugs. Primaquine (Scheme 1, **1**) is the only clinically approved drug that eliminates liver forms of *Plasmodium*, including hypnozoites, while displaying moderate blood stage potency. However, the methemoglobinemia side effect, shared with other 8-aminoquinolines,<sup>9,10</sup> limits its clinical use and urges the discovery of safer and more effective liver stage antimalarial drugs. Breaking with traditional antimalarial drug discovery efforts, focused mainly on the intraerythrocytic stage of infection, we and others have initiated programs toward the

**Scheme 1. Structures of Primaquine, Halofuginone, Clopidol, 4a, and Quinolin-4(1*H*)-imines 5a–n**

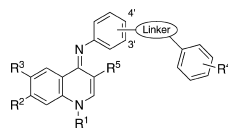


discovery of antimalarials with new chemotypes and differentiated modes of action that target the underexploited liver stage of infection.<sup>11–19</sup> For example, halofuginone, **2**, was discovered to block early- and late-stage parasite development in the liver.<sup>20</sup>

Here, we disclose a series of novel, dual-stage antiplasmodial quinolin-4(1*H*)-imine inhibitors. In particular, **5g** and **5k** kill *Plasmodium* liver stages in low nanomolar concentrations. We

Received: February 16, 2013



**Table 1. Structure and Antiplasmodial Activity of Quinolin-4(1H)-imines 5a–n, 4a, Clopidol, Primaquine (PQ), Chloroquine (CQ), and Halofuginone (HF) and Atovaquone (ATV)**

compd	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>	linker	antiplasmodial activity (IC <sub>50</sub> , μM)		log (K <sub>a</sub> , μM) <sup>c</sup>	hemozoin inhibition (IC <sub>50</sub> , μM)	CC <sub>50</sub> (μM) <sup>d</sup> (Sel. Index <sup>e</sup> )
							blood stage <sup>a</sup>	liver stage <sup>b</sup>			
5a	Et	Cl	H	4-OCF <sub>3</sub>	H	3'-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	3.11	0.227	5.2	ND <sup>f</sup>	3.94 (17.4)
5b	Et	CF <sub>3</sub>	H	4-OCF <sub>3</sub>	H	3'-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	1.67	0.235	4.9	ND	6.09 (25.9)
5c	Et	Cl	H	H	H		0.54	0.200	5.6	18.9	4.61 (23.6)
5d	Et	CF <sub>3</sub>	H	H	H		0.59	0.575	5.7	17.0	7.04 (12.2)
5e	Et	Cl	H	H	H	4'-CH <sub>2</sub>	1.69	0.589	5.0	ND	2.89 (4.91)
5f	Et	Cl	H	H	H	4'-O	0.89	0.214	5.4	ND	5.33 (24.9)
5g	Et	Cl	H	4-Cl	H	4'-O	1.09	0.087	5.1	16.2	2.69 (30.9)
5h	Et	Cl	H	4-OCF <sub>3</sub>	H	4'-O	0.96	0.145	4.9	13.5	3.53 (24.3)
5i	Et	Cl	H	4-CF <sub>3</sub>	H	4'-O	1.26	0.234	4.7	ND	3.20 (13.7)
5j	Me	Cl	H	4-CF <sub>3</sub>	H	4'-O	1.08	0.229	4.9	ND	3.08 (13.4)
5k	Et	Cl	H	3-OCF <sub>3</sub>	H	4'-O	1.18	0.081	5.1	15.4	5.16 (63.7)
5l	Et	CF <sub>3</sub>	H	3-OCF <sub>3</sub>	H	4'-O	1.56	0.537	3.9	ND	12.89 (24.0)
5m	Me	H	F	H	CO <sub>2</sub> Et		5.88	>10	ND	ND	ND
5n	Et	H	F	H	CO <sub>2</sub> Et		5.32	>10	ND	ND	ND
4a							3.46 <sup>21</sup>	0.407	ND	ND	ND
clopidol							9.73 <sup>21</sup>	1.46	4.7	ND	ND
PQ							3.3 <sup>32</sup>	7.5	ND	ND	ND
CQ							0.052	ND	4.8	6.6	ND
HF							ND	0.017	ND	ND	ND
ATV							0.0012 <sup>21</sup>	3.76 × 10 <sup>-4</sup>	ND	ND	ND

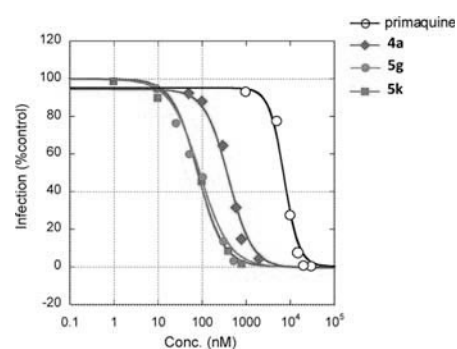
<sup>a</sup>Choroquine-resistant *P. falciparum* W2 strain. <sup>b</sup>*P. berghei*. <sup>c</sup>Binding to hematin. <sup>d</sup>HepG2 cells. <sup>e</sup>Selectivity index = CC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>. <sup>f</sup>ND: not determined.

also present our efforts to unveil their mechanisms of action and potential polypharmacological profile.

## RESULTS AND DISCUSSION

Having noticed that our previously reported pyridon-4(1H)-imines **4**, designed to target the mitochondrial cytochrome *bc*<sub>1</sub> complex from the parasite, using clopidol as starting point for the optimization process, were only moderately active against the multiresistant *Plasmodium falciparum* W2 strain<sup>21</sup> but significantly potent against *Plasmodium berghei*-infected Huh-7 hepatoma cells (Supporting Information (SI)), we reasoned that **4a** could serve as a lead structure for further improvement of anti liver stage activity. Importantly, **4a** showed higher potency than primaquine (IC<sub>50</sub> = 0.4 vs 7.5 μM, Table 1 and Figure 1) in a standard in vitro assay using the Huh-7 hepatoma cell line. To optimize activity of **4a** against EEFs, we conducted docking studies and envisaged that an additional aromatic ring at the core scaffold would favor hydrophobic interactions at the Q<sub>B</sub> binding pocket of cytochrome *bc*<sub>1</sub>, a prominent drug target in liver stage malaria (SI).

**5a–n** were synthesized following procedures similar to those used to prepare their first generation counterparts<sup>21</sup> (Scheme 2A). 4-Phenoxyanilines were prepared via aromatic nucleophilic substitution followed by reduction of the nitro group to the aniline intermediates **8a–e** (Scheme 2B). Access to **5m** and **5n** required synthesis of the corresponding quinolone precursor, **9**, which was subsequently converted into the corresponding 4-chloroquinoline by reaction with POCl<sub>3</sub> (Scheme 2C). X-ray analysis of **5c**, and NOESY spectra in other cases, confirmed the

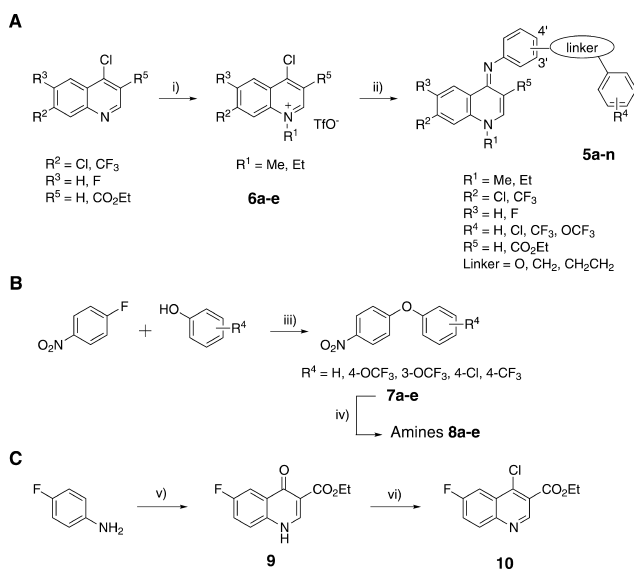


**Figure 1.** Concentration–response sigmoidal curves of primaquine, **4a**, **5g**, and **5k**. Huh-7 hepatoma cells infected with *P. berghei* were incubated with increasing concentrations of inhibitor.

stereochemistry of the C=N bond (SI). Only the *E* isomer was obtained, in accordance with previous reports.<sup>22,23</sup>

Having a series of novel quinolin-4(1H)-imines in hand, we tested the ability of these compounds to inhibit the liver stage of *P. berghei* in vitro (SI). In general, compounds **5** revealed moderate to high potency against EEFs, with IC<sub>50</sub> values in the nanomolar range (Table 1). Derivatives **5g** and **5k** were ca. 94-fold more active than the reference compound primaquine in vitro (Figure 1) and present IC<sub>50</sub> values in the same order of magnitude as the recently disclosed imidazopiperazines.<sup>24</sup> Also, **5g** and **5k** displayed an IC<sub>50</sub> value in the same order of magnitude of halofuginone (IC<sub>50</sub> = 17 nM) but were less potent than atovaquone (IC<sub>50</sub> = 0.376 nM). For this series of compounds, an



Scheme 2. Synthetic Pathway for 5a–n<sup>a</sup>

oxygen linker appears to be important for activity against the liver stage of infection (**5g**, **5k**). Furthermore, the anti liver stage activity does not correlate with the substituent electronic<sup>25</sup> and lipophilic<sup>26</sup> constants (**5f** vs **5g** vs **5h** vs **5j**). In contrast, **5m–n** exhibited only poor activity at the highest concentration tested of 10  $\mu$ M. **5k** presented a selectivity index of ca. 64 and did not show detectable aggregation up to 10  $\mu$ M, which could have led to measuring artifacts and false positive results (SI).

Next, we evaluated the antiparasmodial activity of the quinolin-4(1H)-imines **5a–n** against the *P. falciparum* W2 strain to determine whether these compounds would also be active against the blood stage of the infection. Contrasting with their potent anti liver stage activity, **5a–n** were only moderately active against the blood stage of infection (Table 1). Biaryl compounds **5c** and **5d** were the most potent within the series, presenting IC<sub>50</sub> values of ca. 0.55  $\mu$ M and suggesting that introduction of spacers between the two aromatic systems is detrimental for intra-erythrocytic activity. Regarding the 4-phenoxy derivatives, the substituent effect on the activity is apparently opposed to what had been reported for 4(1H)-pyridones<sup>27</sup> and pyridon-4(1H)-imines.<sup>21</sup> Overall, while the differences of activity could be explained on the grounds of dissimilar assay conditions and different parasite species, it is also possible that different mechanisms of action are at play in either life cycle stage.

Quinolin-4(1H)-imines **5** are structurally related to 4(1H)-quinolones, and several compounds of the latter class have shown antiparasmodial, blood and liver stage activities, via cytochrome *bc*<sub>1</sub> inhibition.<sup>11,14–16,28–30</sup> Hence, we investigated whether the activity of the present series of compounds was a consequence of *bc*<sub>1</sub> complex inhibition (SI). The mitochondrial electron transport-chain is used for maintaining the electrochemical gradient across the mitochondrial membrane and as ubiquinone regenerator for dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) enzymatic activity. DHODH is a key enzyme for de novo pyrimidine biosynthesis, which *Plasmodium* spp. cannot salvage.<sup>28</sup> We selected one of the most (**5k**) and one of the

least active (**5d**) compounds for these biochemical assays. As presented in Table 2, both compounds can inhibit cytochrome

**Table 2. Sensitivity of Ubiquinol:Cytochrome *bc*<sub>1</sub> Activity in Isolated Mitochondria to **5d** and **5k****

IC <sub>50</sub> $\pm$ SD ( $\mu$ M)		
<b>5d</b>	<b>5k</b>	atovaquone
28 $\pm$ 4.2	1.2 $\pm$ 0.21	0.0003 $\pm$ 0.0001

*bc*<sub>1</sub> but only in the micromolar range. Given the order of magnitude of these IC<sub>50</sub> values, it is unlikely that inhibition of cytochrome *bc*<sub>1</sub> is their primary mode of antiparasmodial action. To confirm this hypothesis, we then carried out a series of experiments on a *Saccharomyces cerevisiae* cytoplasmatic DHODH-expressing *P. falciparum* Dd2 strain. In short, this transgenic strain can bypass the *P. falciparum* DHODH counterpart by using ScDHODH. Interestingly, ScDHODH uses cytoplasmatic fumarate instead of mitochondrial ubiquinone as final electron acceptor, thereby making the parasite resistant to both PfDHODH and *bc*<sub>1</sub> complex inhibitors.<sup>31</sup> Addition of proguanil restores sensitivity of the transgenic Dd2-yDHODH strain to *bc*<sub>1</sub> but does not show any effect with specific PfDHODH inhibitors. Overall, the results suggest that the mitochondrial electron transport chain is not the primary target of **5d** and **5k** (SI), as both compounds did not show loss of activity in the transgenic Dd2-yDHODH, with or without proguanil, versus the control Dd2 line.

Alongside the mitochondrial electron transport chain, Tarun et al. had previously reported the redox metabolism, and the fatty acid synthesis II pathway as highly active in liver stage.<sup>33</sup> Thioredoxin reductase is a putative enzyme expressed in liver stage with ideal characteristics for drug targeting.<sup>34</sup> Furthermore, enoyl-acyl carrier protein reductase catalyzes the rate-limiting step of de novo fatty acid biosynthesis and its blockage is associated with reduced infectivity of the human host.<sup>35,36</sup> Screening of **5d** and **5k** against both enzymes did not show noticeable activity up to 50  $\mu$ M (data not shown), ruling out these pathways as drug targets.

Because these compounds display a quinoline-based scaffold, it was also investigated whether they would bind to heme, in resemblance to chloroquine. UV–visible spectroscopy was used to determine accurately the binding equilibrium constant, *K*<sub>a</sub> (Table 1).<sup>37</sup> All experimental data fitted best to a 1:1 binding stoichiometry model. Under these experimental conditions, chloroquine presented a log *K*<sub>a</sub> of 4.8, which is in accordance with literature values.<sup>38</sup> **5a–l** also bound to heme with similar *K*<sub>a</sub> as chloroquine, suggesting the inhibition of heme crystallization to hemozoin as a possible mechanism of action in blood stages of infection but not in liver stage, where this metabolic process does not occur. Building on these preliminary results, **5c**, **5d**, **5g**, **5h**, and **5k** were confirmed to inhibit heme crystallization (Table 1). Altogether, and opposing the current paradigm of compound selectivity, our data show that compounds **5** may exert dual stage inhibition through modulation of several distinct targets.

Finally, the microsomal stability of a selected set of quinolin-4(1H)-imines was studied by LC–MS/MS. All tested compounds displayed remarkable metabolic stability when incubated in rat liver microsomes, with half-lives ranging from 4 to 8 h (SI). The high metabolic stability may also suggest a low potential of quinolin-4(1H)-imines for drug–drug interactions.<sup>39</sup> Search for metabolites, performed both by MS scan and multiple reaction monitoring (MRM) experiments, allowed us to detect the

corresponding 4-anilinoquinolines, formed presumably by *N*-dealkylation of parent compounds **5** (SI).

## CONCLUSIONS

We have identified a new class and chemotype of dual stage inhibitors. Two compounds presented high potency against liver stage malaria. Our efforts to unveil the mechanisms of action of the synthesized quinolin-4(1*H*)-imines did not identify a unique target, e.g., inhibition of cytochrome *bc*<sub>1</sub> in the  $\mu$ M range is unlikely to account for the observed potent anti liver stage activity. In fact, modulation of multiple targets and potential polypharmacology cannot be excluded for this new chemotype of antiplasmodials. The global urgency in finding new therapies for malaria, especially against the underexplored liver stage, associated with (i) excellent activity of **5g** and **5k** in a phenotypic assay, (ii) chemical tractability, and (iii) suitable ligand efficiency<sup>40</sup> (LE = 0.31 for **5k**), warrants this novel chemotype of liver stage antiplasmodials further development.

## EXPERIMENTAL SECTION

**Synthesis of 5k.** Synthesis of **5k**: Intermediates **6a** (1.0 molar equiv) and **8c** (1.1 molar equiv) were dissolved in ethanol absolute (3.5 mL/mmol). TEA (1 molar equiv) was added to the solution, which was refluxed for 20–24 h. The solvent was evaporated under reduced pressure, and the crude product was purified by flash chromatography, DCM:MeOH (9.5:0.5) to afford **5k** as a yellow oil; 85%. <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 400.13 MHz)  $\delta$  1.56 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, CH<sub>3</sub>), 4.61 (2H, q, *J* = 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>), 6.81 (1H, d, *J* = 7.2 Hz, Ar-H3), 6.99 (1H, br s, Ar-H), 7.10 (2H, m, Ar-H), 7.25 (2H, d, *J* = 9.2 Hz, Ar-H), 7.46 (2H, d, *J* = 9.2 Hz, Ar-H), 7.51 (1H, t, *J* = 9.2 Hz, Ar-H), 7.82 (1H, dd, *J* = 8.8 and 1.6 Hz, Ar-H), 8.26 (1H, s, Ar-H), 8.38 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, Ar-H2), 8.60 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, Ar-H). <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 100.61 MHz)  $\delta$  13.48, 49.72, 100.69, 111.22, 115.52, 116.89, 117.37, 120.44, 125.74, 126.89, 127.17, 127.33, 130.92, 139.11, 140.58, 146.13, 150.08, 152.20, 154.09, 155.55, 155.80, 158.32. IR (film):  $\nu_{\max}$  1613, 1555, 1504, 1440, 1248, 1160, 1025 cm<sup>-1</sup>. ESI-MS *m/z* (abund): 458.95 [M + H]<sup>+</sup> (100). Anal. Calcd (C<sub>26</sub>H<sub>22</sub>ClF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O·0.8CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H): C, 51.45; H, 3.27; N, 4.84%. Found: C, 51.23; H, 3.39; N, 4.79%.

## ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

Syntheses, methods for biochemical and cell-based assays, in vitro data. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*E-mail: [tiago.rodriques@pharma.ethz.ch](mailto:tiago.rodriques@pharma.ethz.ch). Tel: +41446339113.

### Notes

The authors declare the following competing financial interest(s): G.S. is a scientific consultant to pharmaceutical industry and a co-founder of AlloCyte Pharmaceuticals Ltd, Basel.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by FCT, Portugal: grants PEst-OE/SAU/UI4013/2011, PTDC/SAU-FCT/098734/2008, PTDC/SAUMIC/117060/2010 (M.P.), BD/30689/2006 (T.R.), BD/51459/2011 (A.R.S.) BPD/64539/2010 (F.P.C.), BPD/64859/2009 (A.S.R.), and by the HMS-Portugal Program in Translational Research and Information HMSP-CT/SAU-ICT/0068/2009 (M.M.M. and R.M.). M.P. holds a Ciência 2007 position from the Portuguese Ministry of Science and Technology. M.M.M. is a Howard Hughes Medical Institute International

Scholar, and P.J.R. is a Distinguished Clinical Scientist of the Doris Duke Charitable Foundation. We thank Ivan Caballero for technical contribution and discussions.

## ABBREVIATIONS USED

ATV, atovaquone; CC<sub>50</sub>, half-maximum cytotoxic concentration; CQ, chloroquine; DHODH, dihydroorotate dehydrogenase; EEf, exoerythrocytic form; HF, halofuginone; K<sub>a</sub>, association constant; LE, ligand efficiency; MRM, multiple reaction monitoring; ND, not determined; PQ, primaquine; SD, standard deviation; Sel. Index, selectivity index; SI, Supporting Information; TEA, triethylamine; TES, triethylsilane

## REFERENCES

- (1) *World Malaria Report 2011*; World Health Organization: Geneva, 2011.
- (2) Gamo, F.-J.; Sanz, L. M.; Vidal, J.; de Cozar, C.; Alvarez, E.; Lavandera, J.-L.; Vanderwall, D. E.; Green, D. V. S.; Kumar, V.; Hasan, S.; Brown, J. R.; Peishoff, C. E.; Cardon, L. R.; Garcia-Bustos, J. F. Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. *Nature* **2010**, *465*, 305–310.
- (3) Guiguemde, W. A.; Shelat, A. A.; Bouck, D.; Duffy, S.; Crowther, G. J.; Davis, P. H.; Smithson, D. C.; Connelly, M.; Clark, J.; Zhu, F.; Jiménez-Díaz, M. B.; Martínez, M. S.; Wilson, E. B.; Tripathi, A. K.; Gut, J.; Sharlow, E. R.; Bathurst, I.; Mazouni, F. E.; Fowble, J. W.; Forquer, I.; McGinley, P. L.; Castro, S.; Angulo-Barturen, I.; Ferrer, S.; Rosenthal, P. J.; DeRisi, J. L.; Sullivan, D. J.; Lazo, J. S.; Roos, D. S.; Riscoe, M. K.; Phillips, M. A.; Rathod, P. K.; Voorhis, W. C. V.; Avery, V. M.; Guy, R. K. Chemical genetics of *Plasmodium falciparum*. *Nature* **2010**, *465*, 311–315.
- (4) The malERA Consultative Group on Drugs. A research agenda for malaria eradication: drugs. *PLoS Med.* **2011**, *8*, e1000402.
- (5) Prudêncio, M.; Rodriguez, A.; Mota, M. M. The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nature Rev. Microbiol.* **2006**, *4*, 849–856.
- (6) Rodrigues, T.; Prudêncio, M.; Moreira, R.; Mota, M. M.; Lopes, F. Targeting the liver stage of malaria parasites: a yet unmet goal. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 995–1012.
- (7) Wells, T. N. C.; Burrows, J. N.; Baird, J. K. Targeting the hypnozoite reservoir of *Plasmodium vivax*: the hidden obstacle to malaria elimination. *Trends Parasitol.* **2010**, *26*, 145–151.
- (8) Mazier, D.; Rénia, L.; Snounou, G. A pre-emptive strike against malaria's stealthy hepatic forms. *Nature Rev. Drug Discovery* **2009**, *8*, 854–864.
- (9) Srivastava, P.; Singh, S.; Jain, G. K.; Puri, S. K.; Pandey, V. C. A simple and rapid evaluation of methemoglobin toxicity of 8-aminoquinolines and related compounds. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2000**, *45*, 236–239.
- (10) Hill, D. R.; Baird, J. K.; Parise, M. E.; Lewis, L. S.; Ryan, E. T.; Magill, A. J. Primaquine: report from CDC expert meeting on malaria chemoprophylaxis I. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2006**, *75*, 402–415.
- (11) da Cruz, F. P.; Martin, C.; Buchholz, K.; Lafuente-Monasterio, M. J.; Rodrigues, T.; Sönnichsen, B.; Moreira, R.; Gamo, F.-J.; Marti, M.; Mota, M. M.; Hannus, M.; Prudêncio, M. Drug screen targeted at plasmodium liver stages identifies a potent multistage antimalarial drug. *J. Infect. Dis.* **2012**, *205*, 1278–1286.
- (12) Derbyshire, E. R.; Prudêncio, M.; Mota, M. M.; Clardy, J. Liver-stage malaria parasites vulnerable to diverse chemical scaffolds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 8511–8516.
- (13) Pérez, B. C.; Teixeira, C.; Albuquerque, I. S.; Gut, J.; Rosenthal, P. J.; Gomes, J. R. B.; Prudêncio, M.; Gomes, P. N-Cinnamoylated chloroquine analogues as dual-stage antimalarial leads. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 556–567.
- (14) Biagini, G. A.; Fisher, N.; Shone, A. E.; Mubarak, M. A.; Srivastava, A.; Hill, A.; Antoine, T.; Warman, A. J.; Davies, J.; Pidathala, C.; Amewu, R. K.; Leung, S. C.; Sharma, R.; Gibbons, P.; Hong, D. W.; Pacorel, B.; Lawrenson, A. S.; Charoensuththivarakul, S.; Taylor, L.;

- Berger, O.; Mbekeani, A.; Stocks, P. A.; Nixon, G. L.; Chadwick, J.; Hemingway, J.; Delves, M. J.; Sinden, R. E.; Zeeman, A.-M.; Kocken, C. H. M.; Berry, N. G.; O'Neill, P. M.; Ward, S. A. Generation of quinolone antimalarials targeting the *Plasmodium falciparum* mitochondrial respiratory chain for the treatment and prophylaxis of malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 8298–8303.
- (15) Zhang, Y.; Clark, J. A.; Connelly, M. C.; Zhu, F.; Min, J.; Guiguemde, W. A.; Pradhan, A.; Iyer, L.; Furimsky, A.; Gow, J.; Parman, T.; Mazouni, F. E.; Phillips, M. A.; Kyle, D. E.; Mirsalis, J.; Guy, R. K. Lead optimization of 3-carboxyl-4(1H)-quinolones to deliver orally bioavailable antimalarials. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4205–4219.
- (16) LaCrue, A. N.; Sáenz, F. E.; Cross, R. M.; Udenze, K. O.; Monastyrskyi, A.; Stein, S.; Mutka, T. S.; Manetsch, R.; Kyle, D. E. 4(1H)-Quinolones with liver stage activity against *Plasmodium berghiei*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 417–424.
- (17) Winter, R. W.; Kelly, J. X.; Smilkstein, M. J.; Dodean, R.; Hinrichs, D.; Riscoe, M. K. Antimalarial quinolones: synthesis, potency, and mechanistic studies. *Exp. Parasitol.* **2008**, *118*, 487–497.
- (18) Cross, R. M.; Monastyrskyi, A.; Mutka, T. S.; Burrows, J. N.; Kyle, D. E.; Manetsch, R. Endochin optimization: structure–activity and structure–property relationship studies of 3-substituted 2-methyl-4(1H)-quinolones with antimalarial activity. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 7076–7094.
- (19) Nilsen, A.; LaCrue, A. N.; White, K. L.; Forquer, I. P.; Cross, R. M.; Marfurt, J.; Mather, M. W.; Delves, M. J.; Shackelford, D. M.; Saenz, F. E.; Morrissey, J. M.; Steuten, J.; Mutka, T.; Li, Y.; Wirjanata, G.; Ryan, E.; Duffy, S.; Kelly, J. X.; Sebayang, B. F.; Zeeman, A.-M.; Noviyanti, R.; Sinden, R. E.; Kocken, C. H. M.; Price, R. N.; Avery, V. M.; Angulo-Barturen, I.; Jiménez-Díaz, M. B.; Ferrer, S.; Herreros, E.; Sanz, L. M.; Gamo, F.-J.; Bathurst, I.; Burrows, J. N.; Siegl, P.; Guy, R. K.; Winter, R. W.; Vaidya, A. B.; Charman, S. A.; Kyle, D. E.; Manetsch, R.; Riscoe, M. K. Quinolone-3-diarylethers: a new class of antimalarial drug. *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5*, 177ra37.
- (20) Derbyshire, E. R.; Mazitschek, R.; Clardy, J. Characterization of plasmodium liver stage inhibition by halofuginone. *ChemMedChem* **2012**, *7*, 844–849.
- (21) Rodrigues, T.; Guedes, R. C.; dos Santos, D. J. V. A.; Carrasco, M.; Gut, J.; Rosenthal, P. J.; Moreira, R.; Lopes, F. Design, synthesis and structure–activity relationships of (1H-pyridin-4-ylidene)amines as potential antimalarials. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 3476–3480.
- (22) Rodrigues, T.; Moreira, R.; Dacunha-Marinho, B.; Lopes, F. Bis{[(E)-3[(diethylmethylammonio)methyl]-N-[3-(N,N-dimethylsulfamoyl)-1-methylpyridin-4-ylidene]-4-methoxyanilinium}] tetraiodide pentahydrate. *Acta Crystallogr., Sect. E: Struct. Rep. Online* **2009**, *65*, O283–U1828.
- (23) Lopes, F.; Capela, R.; Gonçalves, J. O.; Horton, P. N.; Hursthouse, M. B.; Iley, J.; Casimiro, C. M.; Bom, J.; Moreira, R. Amidomethylation of amodiaquine: antimalarial N-Mannich base derivatives. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 7663–7666.
- (24) Meister, S.; Plouffe, D. M.; Kuhen, K. L.; Bonamy, G. M. C.; Wu, T.; Barnes, S. W.; Bopp, S. E.; Borboa, R.; Bright, A. T.; Che, J.; Cohen, S.; Dharia, N. V.; Gagaring, K.; Gettayacamin, M.; Gordon, P.; Groessl, T.; Kato, N.; Lee, M. C. S.; McNamara, C. W.; Fidock, D. A.; Nagle, A.; Nam, T.-g.; Richmond, W.; Roland, J.; Rottmann, M.; Zhou, B.; Froissard, P.; Glynn, R. J.; Mazier, D.; Sattabongkot, J.; Schultz, P. G.; Tuntland, T.; Walker, J. R.; Zhou, Y.; Chatterjee, A.; Diagana, T. T.; Winzler, E. A. Imaging of Plasmodium liver stages to drive next-generation antimalarial drug discovery. *Science* **2011**, *334*, 1372–1377.
- (25) Hansch, C.; Leo, A.; Taft, R. W. A survey of Hammett substituent constants and resonance and field parameters. *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 165–195.
- (26) Hansch, C.; Leo, A.; Unger, S. H.; Kim, K. H.; Nikaitani, D.; Lien, E. J. Aromatic substituent constants for structure–activity correlations. *J. Med. Chem.* **1973**, *16*, 1207–1216.
- (27) Yeates, C. L.; Batchelor, J. F.; Capon, E. C.; Cheesman, N. J.; Fry, M.; Hudson, A. T.; Pudney, M.; Trimming, H.; Woolven, J.; Bueno, J. M.; Chicharro, J.; Fernández, E.; Fiandor, J. M.; Gargallo-Viola, D.; Gómez de las Heras, F.; Herreros, E.; León, M. L. Synthesis and structure–activity relationships of 4-pyridones as potential antimalarials. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2845–2852.
- (28) Rodrigues, T.; Lopes, F.; Moreira, R. Inhibitors of the mitochondrial electron transport chain and de novo pyrimidine biosynthesis as antimalarials: the present status. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 929–956.
- (29) Cowley, R.; Leung, S.; Fisher, N.; Al-Helal, M.; Berry, N. G.; Lawrenson, A. S.; Sharma, R.; Shone, A. E.; Ward, S. A.; Biagini, G. A.; O'Neil, P. M. The development of quinolone esters as novel antimalarial agents targeting the *Plasmodium falciparum* bc1 protein complex. *Med. Chem. Commun.* **2012**, *3*, 39–44.
- (30) Pidathala, C.; Amewu, R.; Pacorel, B.; Nixon, G. L.; Gibbons, P.; Hong, W. D.; Leung, S. C.; Berry, N. G.; Sharma, R.; Stocks, P. A.; Srivastava, A.; Shone, A. E.; Charoensutthivarakul, S.; Taylor, L.; Berger, O.; Mbekeani, A.; Hill, A.; Fisher, N. E.; Warman, A. J.; Biagini, G. A.; Ward, S. A.; O'Neill, P. M. Identification, design and biological evaluation of bisaryl quinolones targeting *Plasmodium falciparum* type II NADH:quinone oxidoreductase (PfNDH2). *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 1831–1843.
- (31) Painter, H. J.; Morrissey, J. M.; Mather, M. W.; Vaidya, A. B. Specific role of mitochondrial electron transport in blood-stage *Plasmodium falciparum*. *Nature* **2007**, *446*, 88–91.
- (32) Vale, N.; Prudêncio, M.; Marques, C. A.; Collins, M. S.; Gut, J.; Nogueira, F.; Matos, J.; Rosenthal, P. J.; Cushion, M. T.; do Rosario, V. E.; Mota, M. M.; Moreira, R.; Gomes, P. Imidazoquinones as antimalarial and antipneumocystis agents. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 7800–7807.
- (33) Tarun, A. S.; Peng, X.; Dumpit, R. F.; Ogata, Y.; Silva-Rivera, H.; Camargo, N.; Daly, T. M.; Bergman, L. W.; Kappe, S. H. I. A combined transcriptome and proteome survey of malaria parasite liver stages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *115*, 305–310.
- (34) Andricopuloa, A. D.; Akoachere, M. B.; Krogh, R.; Nickel, C.; McLeish, M. J.; Kenyon, G. L.; Arscott, L. D.; Williams, C. H., Jr.; Davioud-Charvet, E.; Becker, K. Specific inhibitors of *Plasmodium falciparum* thioredoxin reductase as potential antimalarial agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2283–2292.
- (35) Ralph, S. A.; van Dooren, G. G.; Waller, R. F.; Crawford, M. J.; Fraunholz, M. J.; Foth, B. J.; Tonkin, C. J.; Roos, D. S.; McFadden, G. I. Tropical infectious diseases: metabolic maps and functions of the *Plasmodium falciparum* apicoplast. *Nature Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 203–216.
- (36) Yu, M.; Kumar, T. R. S.; Nkrumah, L. J.; Coppi, A.; Retzlaff, S.; Li, C. D.; Kelly, B. J.; Moura, P. A.; Lakshmanan, V.; Freundlich, J. S.; Valderramos, J.-C.; Vilcheze, C.; Siedner, M.; Tsai, J. H.-C.; Falkard, B.; Sidhu, A. b. S.; Purcell, L. A.; Grattraud, P.; Kremer, L.; Waters, A. P.; Schiehsler, G.; Jacobus, D. P.; Janse, C. J.; Ager, A.; William R. Jacobs, J.; Sacchettini, J. C.; Heussler, V.; Sinnis, P.; Fidock, D. A. The fatty acid biosynthesis enzyme FabI plays a key role in the development of liver-stage malarial parasites. *Cell Host Microbe* **2008**, *4*, 567–578.
- (37) Egan, T. Interactions of quinoline antimalarials with hemoan in solution. *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 916–926.
- (38) Egan, T. F.; Mavuso, W. W.; Ross, D. C.; Marques, H. M. Thermodynamic factors controlling the interaction of quinoline antimalarial drugs with ferriprotoporphyrin IX. *J. Inorg. Biochem.* **1997**, *68*, 137–145.
- (39) Li, A. P. Preclinical in vitro screening assays for drug-like properties. *Drug Discovery Today: Technol.* **2005**, *2*, 179–185.
- (40) Hopkins, A. L.; Groom, C. R.; Alex, A. Ligand efficiency: a useful metric for lead selection. *Drug Discovery Today* **2004**, *15*, 430–431.



# Structural Optimization of Quinolon-4(1*H*)-imines as Dual-Stage Antimalarials: Toward Increased Potency and Metabolic Stability

Ana S. Ressurreição,<sup>\*,†,∞</sup> Daniel Gonçalves,<sup>†,∞</sup> Ana R. Siteo,<sup>†</sup> Inês S. Albuquerque,<sup>‡</sup> Jiri Gut,<sup>||</sup> Ana Góis,<sup>‡</sup> Lúcia M. Gonçalves,<sup>†</sup> Maria R. Bronze,<sup>†</sup> Thomas Hanscheid,<sup>‡</sup> Giancarlo A. Biagini,<sup>⊥</sup> Philip J. Rosenthal,<sup>||</sup> Miguel Prudêncio,<sup>‡</sup> Paul O'Neill,<sup>#</sup> Maria M. Mota,<sup>‡</sup> Francisca Lopes,<sup>†</sup> and Rui Moreira<sup>†</sup>

<sup>†</sup>Research Institute for Medicines and Pharmaceutical Sciences (iMed.UL), Faculty of Pharmacy, University of Lisbon, Av. Prof. Gama Pinto, 1649-019 Lisbon, Portugal

<sup>‡</sup>Instituto de Medicina Molecular, Faculty of Medicine, University of Lisbon, Av. Prof. Egas Moniz, 1649-028 Lisbon, Portugal

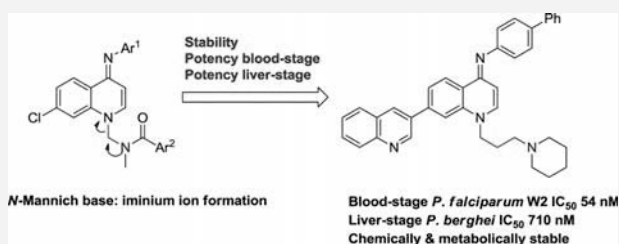
<sup>||</sup>Department of Medicine, San Francisco General Hospital, University of California, Box 0811, San Francisco, California 94143, United States

<sup>⊥</sup>Liverpool School of Tropical Medicine, Pembroke Place, Liverpool, L3 5QA, U.K.

<sup>#</sup>Department of Chemistry, University of Liverpool, Liverpool, L69 3BX, U.K.

## Supporting Information

**ABSTRACT:** Discovery of novel effective and safe antimalarials has been traditionally focused on targeting erythrocytic parasite stages that cause clinical symptoms. However, elimination of malaria parasites from the human population will be facilitated by intervention at different life-cycle stages of the parasite, including the obligatory developmental phase in the liver, which precedes the erythrocytic stage. We have previously reported that *N*-Mannich-based quinolon-4(1*H*)-imines are potent antiplasmodial agents but present several stability liabilities. We now report our efforts to optimize quinolon-4(1*H*)-imines as dual-stage antiplasmodial agents endowed with chemical and metabolic stability. We report compounds active against both the erythrocytic and exoerythrocytic forms of malaria parasites, such as the quinolon-4(1*H*)-imine **5p** (IC<sub>50</sub> values of 54 and 710 nM against the erythrocytic and exoerythrocytic forms), which constitute excellent starting points for further lead optimization as dual-stage antimalarials.



## INTRODUCTION

Malaria remains a major global public health problem, affecting over 200 million people mainly in tropical and subtropical regions and with an estimated death toll of nearly 800 000 individuals in 2011.<sup>1,2</sup> Five species from the genus *Plasmodium* cause infection in humans. Of these, *P. falciparum* and *P. vivax* account for more than 95% of malaria cases, with *P. falciparum* responsible for most of the deaths caused by malaria every year. The rapid evolution and spread of parasite resistance to most available antimalarial drugs threaten the use of these agents to treat and prevent malaria.<sup>3,4</sup> To address the need for new and safe drugs for treating or preventing malaria, large phenotypic high-throughput screening campaigns<sup>5,6</sup> have been performed to discover novel chemotypes acting against erythrocytic stage parasites, which are responsible for the clinical features of malaria. However, global control and eventual eradication of malaria will benefit from action against multiple parasite life-cycle stages.<sup>7,8</sup>

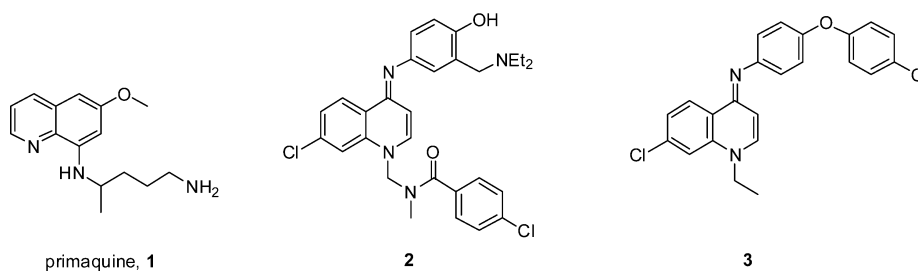
Malaria parasites undergo an asymptomatic, obligatory developmental phase in the liver, which precedes the formation of the erythrocytic stage.<sup>9</sup> In addition, *P. vivax* and *P. ovale* infections also generate liver forms, called hypnozoites, that are

not eliminated by standard therapy, persist in the liver for long periods, and upon reactivation, are responsible for relapses of malaria.<sup>10</sup> Thus, the liver stage of infection offers an important target for intervention in addition to erythrocytic stages. Indeed, eradication of liver-stage parasites can provide causal prophylaxis, with elimination of parasites before the development of symptomatic infection.<sup>11</sup> Drugs active against hypnozoites will also facilitate malaria elimination campaigns.<sup>10,12</sup> Primaquine (**1**, Figure 1), an 8-aminoquinoline (8-AQ), acts against liver forms of all *Plasmodium* species and is the only available antimalarial that acts against *P. vivax* and *P. ovale* hypnozoites, thereby preventing relapses after treatment for malaria. However, primaquine has significant side effects, including hemolysis in patients with glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency, a common genetic abnormality in malaria-endemic regions.<sup>13</sup> The liver stage of infection has been underexploited as an antimalarial target because of the poorly understood biology of *Plasmodium* liver stages and technical difficulties in studying them.<sup>11,14</sup> Only recently have systematic

Received: July 28, 2013

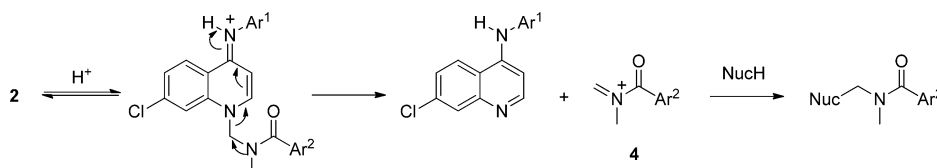
Published: September 10, 2013





**Figure 1.** Structures of primaquine (1), a *N*-Mannich-based quinolon-4(1*H*)-imine (2), and a *N*-alkyl-quinolon-4(1*H*)-imine (3).

**Scheme 1. Mechanism for the Acid-Catalyzed Hydrolysis of *N*-Mannich-Based Quinolon-4(1*H*)-imine, 2**



efforts toward the identification of novel scaffolds active against *Plasmodium* liver stages, including phenotypic approaches, resulted in the discovery of potent compounds.<sup>15–17</sup>

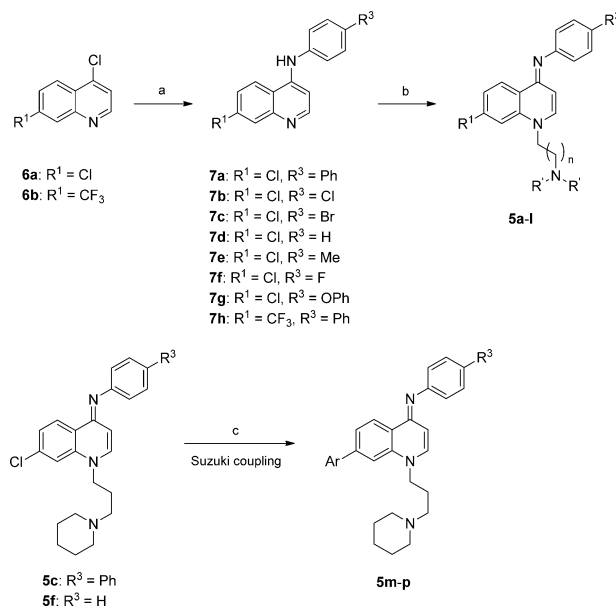
We previously reported that *N*-Mannich-based quinolon-4(1*H*)-imines derived from amodiaquine (e.g., 2, Figure 1) are potent antiparasitic agents, with low nanomolar IC<sub>50</sub> values against the chloroquine-resistant *P. falciparum* Dd2 strain.<sup>18</sup> Quinolon-4(1*H*)-imines 2 were shown to hydrolyze to amodiaquine in aqueous solutions, particularly at low pH values, thus raising the possibility of these compounds acting as chemically activated prodrugs. The mechanism of hydrolysis probably involves protonation of the 4-imino nitrogen atom, followed by alkyl C–N bond scission via an S<sub>N</sub>1 mechanism, leading to the formation of amodiaquine and the corresponding secondary amide (Scheme 1).<sup>18</sup> This mechanism is similar to that reported for the acid-catalyzed hydrolysis of *N*-acyloxymethyl<sup>19–21</sup> and *N*-amidomethyl prodrugs<sup>22</sup> and involves the formation of an iminium ion intermediate, 4, which can alkylate biomolecules, potentially contributing to toxicity.<sup>23</sup> More recently, we have disclosed a library of *N*-alkyl-quinolon-4(1*H*)-imines (e.g., 3, Figure 1), lacking the *N*-Mannich base moiety, as potent antiparasitic agents that target the liver stage of infection.<sup>24</sup> However, these compounds were shown to be degraded in rat liver microsomes with half-lives of ~4 h. We now report our strategy to improve stability toward aqueous buffers and microsomal enzymes by introducing an aminoalkyl side chain at the N-1 position while simultaneously exploiting the quinolon-4(1*H*)-imine scaffold to optimize antiparasitic activity (5, Figure 2). The studies herein presented led to the discovery of dual-acting analogues active against both blood

and liver stages of parasites that are chemically and metabolically stable and lack apparent cytotoxicity.

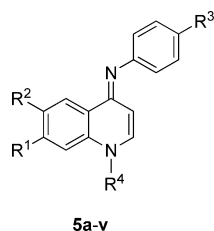
**RESULTS AND DISCUSSION**

**Chemistry.** The general synthetic approach to quinolon-4(1*H*)-imines 5a–p is presented in Scheme 2. Briefly, 4-

**Scheme 2. Synthesis of Quinolon-4(1*H*)-imines 5a–p<sup>a</sup>**



<sup>a</sup>Reagents and conditions: (a) R<sup>3</sup>PhNH<sub>2</sub>, TEA, MeOH, rt, 24 h; (b) chloroalkylamine, NaH, DMF, rt, 5–12 h; (c) PdCl<sub>2</sub>(Ph<sub>3</sub>P)<sub>2</sub>, *t*-BuXphos, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M, boronic acid, dioxane, 100 °C, o/n.



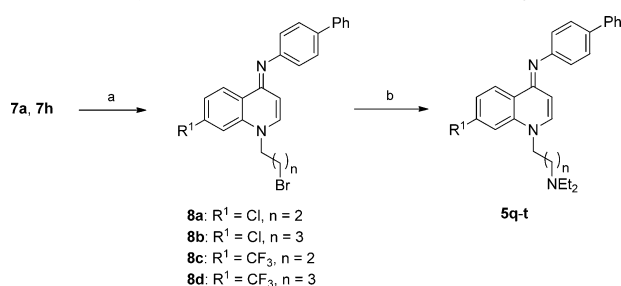
**Figure 2.** General structure for quinolon-4(1*H*)-imines 5 reported in this study. See Table 1 for structures 5a–v.

chloroquinolines 6a and 6b were reacted with the appropriate anilines in methanol and triethylamine to form the corresponding 4-anilinoquinolines 7a–h in very good to excellent yields. Intermediates 7 were subsequently transformed into the target compounds 5a–l in moderate to good yields by reaction with the appropriate chloroalkylamines in DMF in the presence of sodium hydride. X-ray analysis of compound 5c confirmed that the stereochemistry of the C=N bond corresponds to the *E*

isomer, in line with other reports.<sup>25</sup> Compounds **5m–p** were prepared from quinolon-4(1*H*)-imines **5c** and **5f** using Suzuki coupling with the appropriate boronic acids or pinacolyl esters. Surprisingly, the product isolated from the reaction of **5c** with 2-aminopyridine-5-boronic acid pinacol ester matches the C–N coupling product **5o**, as confirmed by mono- and bidimensional NMR analysis (see Supporting Information for NMR spectra and complete peak assignment).

Synthesis of compounds **5q–t** required alkylation of intermediates **7a** and **7h** with 1,3-dibromopropane or 1,4-dibromobutane to give the corresponding bromoalkyl-quinolon-4(1*H*)-imines **8a–d**, which were subsequently converted into the compounds **5q–t** by reaction with diethylamine in dichloromethane (Scheme 3). The route to 6-substituted

**Scheme 3. Synthesis of Quinolon-4(1*H*)-imines **5q–t**<sup>a</sup>**



<sup>a</sup>Reagents and conditions: (a) Br(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>Br or Br(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>Br, NaH, DMF, rt, 5 h; (b) Et<sub>2</sub>NH, THF, rt, o/n.

quinolon-4(1*H*)-imines **5u** and **5v** began with the synthesis of quinolines **6c** and **6d**, following reported procedures.<sup>26,27</sup> Briefly, Gould–Jacobs protocol was applied to the appropriate anilines to form the 6-substituted quinolones **10a** and **10b** (Scheme 4). Hydrolysis of the ethyl ester followed by decarboxylation afforded their analogues **11a** and **11b**, which were converted into the corresponding 4-chloroquinolines by reaction with POCl<sub>3</sub>. Reaction of **6c** and **6d** with the appropriate aniline followed by alkylation and reduction (as

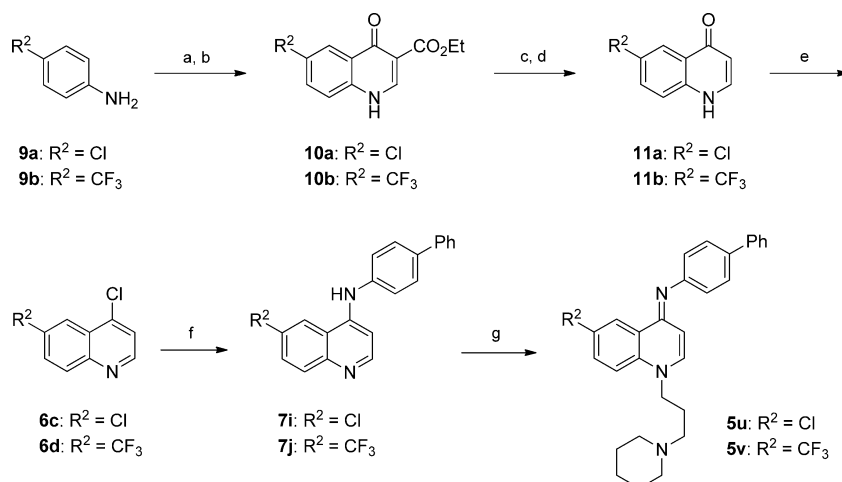
described before) provided the quinolon-4(1*H*)-imines **5u** and **5v** in good yields.

**Activity against the Erythrocytic Stage of Infection and Cytotoxicity.** Compounds **5a–v** were screened for activity against the erythrocytic stage of chloroquine-resistant *P. falciparum* W2 infection and for cytotoxicity against HEK293T mammalian cells (Table 1). Quinolon-4(1*H*)-imines **5** inhibited the growth of parasites with IC<sub>50</sub> values ranging from 50 to 520 nM while displaying negligible cytotoxicity, with EC<sub>50</sub> values against cultured mammalian cells ranging from 7 to ≥100 μM. This result indicates that the quinolon-4(1*H*)-imine scaffold, when attached to an alkylamino side chain through the N-1 nitrogen atom, provides potent antiparasmodial compounds comparable in potency to their *N*-Mannich-base counterparts, **2**,<sup>18</sup> and are approximately 10-fold more potent than the previously reported *N*-alkyl analogues, **3** (IC<sub>50</sub> values ranging from 0.54 to 5.88 μM).<sup>24</sup> In general, most of the compounds **5a–v** presented selectivity indices (SI = EC<sub>50</sub>(HEK293T)/IC<sub>50</sub>(W2)) higher than 300, indicating that quinolon-4(1*H*)-imines are selective and nontoxic.

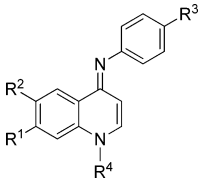
Inspection of the activity data against erythrocytic *P. falciparum* presented in Table 1 reveals that compounds with propyl or butyl linkers between the N-1 nitrogen atom of the quinolon-4(1*H*)-imine and the distal acyclic basic moiety are significantly more potent than those with the ethyl linker (e.g., **5q**, **5r** vs **5a**, and **5s**, **5t** vs **5j**). This difference is not observed for compounds containing a distal cyclic basic moiety (e.g., **5b** and **5c**). However, a reasonable correlation (*R*<sup>2</sup> = 0.76) was observed between the pIC<sub>50</sub> values for the 7-chloro and 7-trifluoromethyl series, suggesting that both series present similar structural requirements regarding the alkylamino side chain at the N-1 nitrogen (Figure 3).

The effect of the electronic and hydrophobic properties of substituents in the quinolon-4(1*H*)-imine scaffold in the activity data in Table 1 was analyzed using the Hansch QSAR method. A good correlation (*R*<sup>2</sup> = 0.82) was found between the pIC<sub>50</sub> values and the Hansch π values for the substituents at the imine moiety, indicating that more lipophilic substituents improve activity against blood-stage parasites (Figure 4). In contrast, the electronic properties of the

**Scheme 4. Synthesis of Quinolon-4(1*H*)-imines **5u** and **5v**<sup>a</sup>**



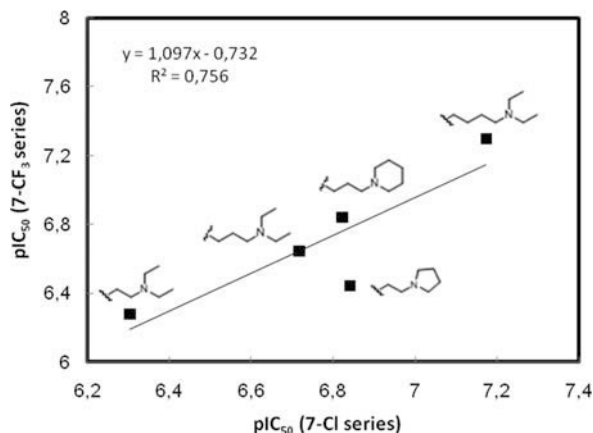
<sup>a</sup>Reagents and conditions: (a) (2-ethoxymethylene)malonate, 110 °C, 2 h; (b) Ph<sub>2</sub>O, reflux, 1 h; (c) NaOH 2 M, MeOH, reflux, 18 h; (d) Ph<sub>2</sub>O, reflux, 1 h; (e) POCl<sub>3</sub>, 140 °C, 4 h; (f) 4-aminobiphenyl, TEA, MeOH, rt, 24 h; (g) 1-(3-chloropropyl)piperidine, NaH, DMF, rt, 12 h.

**Table 1.** Antiplasmodial Activity of Quinolon-4(1*H*)-imines **5a–v** and **3** against Blood and Liver Stages of Infection (*P. falciparum* W2 and *P. berghei*, respectively) and Their Cytotoxicity against Human Embryonic Kidney HEK293T Cells


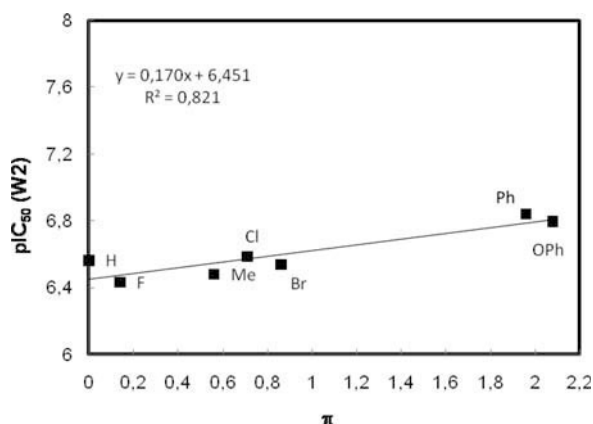
Compd	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	IC <sub>50</sub> (nM)	EC <sub>50</sub> (μM)	SI
					Blood-stage	Liver-stage	HEK293T
<b>5a</b>	Cl	H	Ph		498	ND	74
<b>5b</b>	Cl	H	Ph		111	3460	>900
<b>5c</b>	Cl	H	Ph		144	ND	290
<b>5d</b>	Cl	H	Cl		259	2696	>386
<b>5e</b>	Cl	H	Br		74.0	3010	>1351
<b>5f</b>	Cl	H	H		273	ND	>366
<b>5g</b>	Cl	H	Me		331	ND	>302
<b>5h</b>	Cl	H	F		369	4783	>271
<b>5i</b>	Cl	H	OPh		160	ND	191
<b>5j</b>	CF <sub>3</sub>	H	Ph		525	4614	73
<b>5k</b>	CF <sub>3</sub>	H	Ph		226	ND	>442
<b>5l</b>	CF <sub>3</sub>	H	Ph		360	ND	158
<b>5m</b>		H	H		216	1385	>463
<b>5n</b>		H	Ph		55.4	2070	138
<b>5o</b>		H	Ph		357	440	21
<b>5p</b>		H	Ph		53.7	710	143
<b>5q</b>	Cl	H	Ph		151	ND	>662
<b>5r</b>	Cl	H	Ph		67.6	2653	>1479
<b>5s</b>	CF <sub>3</sub>	H	Ph		144	ND	>694
<b>5t</b>	CF <sub>3</sub>	H	Ph		50.3	ND	>1988
<b>5u</b>	H	Cl	Ph		99.7	ND	219
<b>5v</b>	H	CF <sub>3</sub>	Ph		631	ND	38
<b>3</b>					1090 <sup>a</sup>	87.0 <sup>a</sup>	--
<b>CQ</b>					186	ND	--
<b>PQ</b>					ND	7500 <sup>16</sup>	--

<sup>a</sup>From ref 24. ND: not determined; compounds not active at 1 μM. SI: selectivity index = EC<sub>50</sub>(HEK293T)/IC<sub>50</sub>(W2).



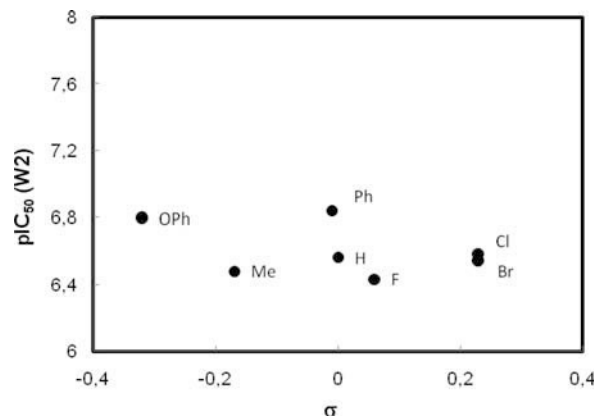


**Figure 3.** Plot of  $pIC_{50}$  against *P. falciparum* W2 for the 7- $CF_3$  series (5j–l,s,t) versus  $pIC_{50}$  for the 7-Cl series (5a–c,q,r). The data are from Table 1

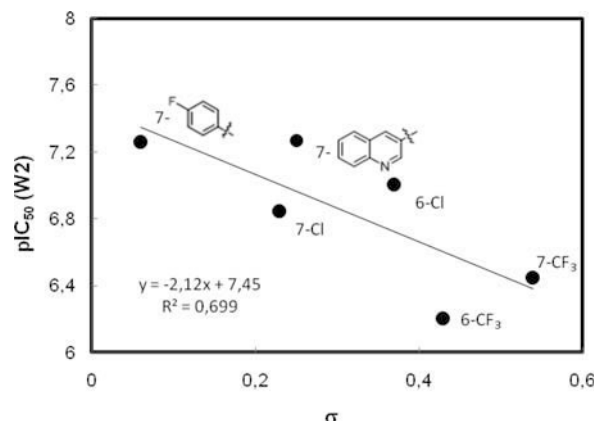


**Figure 4.** Plot of the  $pIC_{50}$  of the quinolon-4(1H)-imines 5c–i (*P. falciparum* W2 strain) versus the Hansch  $\pi$  values of the substituents in para-position of their phenylimine moiety.

substituents at the imine moiety do not affect the antiparasitodal activity (Figure 5). A moderate correlation ( $R^2 = 0.70$ ) was observed between the  $pIC_{50}$  values and the Hammett  $\sigma$  values<sup>28</sup> for substituents in positions C-6 and C-7 of the quinolonimine moiety. Selection of Hammett constants was defined relative to the imine function, and thus,  $\sigma_{para}$  values were used for substituents at C-7 while  $\sigma_{meta}$  values were used for substituents at C-6. As shown in Figure 6, electron-withdrawing substituents at C-6 and C-7 are detrimental to activity of quinolon-4(1H)-imines against erythrocytic parasites. This effect probably reflects a decrease in the basicity of the quinolon-4(1H)-imine, which can be considered as a vinylogous cyclic amidine<sup>29</sup> with subsequent reduction of accumulation in the acidic digestive vacuole (DV) of the parasite, the site of action of aminoquinoline antimalarials. There is strong evidence that pH trapping plays a role in the activity of aminoquinoline antimalarials such as chloroquine.<sup>30</sup> Interestingly, derivative 5o, which contains a 2-pyridylamine substituent at C-7, is equipotent to its 7- $CF_3$  counterpart 5l, a result that might be ascribed to the protonation of the pyridine nitrogen atom within the parasite DV. The protonated 2-



**Figure 5.** Plot of the  $pIC_{50}$  of the quinolon-4(1H)-imines 5c–i (*P. falciparum* W2 strain) versus the Hammett  $\sigma$  values<sup>28</sup> of the substituents in para-position of their phenylimine moiety.



**Figure 6.** Plot of the  $pIC_{50}$  of the quinolon-4(1H)-imines 5c–i (*P. falciparum* W2 strain) versus the Hammett  $\sigma$  values<sup>28</sup> for substituents in positions C-6 and C-7 of the quinolonimine moiety.

pyridylamine is most likely a strong electron-withdrawing substituent, as suggested by the apparent  $\sigma_{ortho}$  value of 3.21 for the  $=NH^+$  moiety (compared to the value of 0.56 for  $=N$  group).<sup>29</sup>

**Inhibition of Heme Polymerization.** *Plasmodium* parasites dispose the free, toxic ferriprotoporphyrin IX (FP) that results from digestion of host erythrocyte hemoglobin by crystallizing it into insoluble hemozoin crystals.<sup>31,32</sup> Recent studies provided robust evidence that chloroquine and other quinoline antimalarials inhibit hemozoin formation by binding to free FP or to the surface of the growing hemozoin crystal.<sup>33,34</sup> Since compounds 5 display a quinoline-related scaffold and two basic sites (the  $pK_a$  values for the quinolon-4(1H)-imine and distal amine groups are approximately 6–7 and 8–9, respectively<sup>35</sup>), which might lead to accumulation in the acidic DV, we investigated whether they could also inhibit hemozoin formation. Selected quinolon-4(1H)-imines 5 were screened using a novel, simple, and efficient *in vitro* method based on the formation of hemozoin-like crystals.<sup>36</sup> The data presented in Table 2 reveal that the tested compounds 5 are either inactive or poor inhibitors of hemozoin formation when

**Table 2. Inhibition of Hemozoin-like Crystal Formation by Selected Quinolone-4(1H)-imines **5** (Middle Column), Chloroquine and Gentamicin (Negative Control), and Comparison to IC<sub>50</sub> Values on Erythrocytic Stage (Right Column)<sup>a</sup>**

compd	MIC (μM)	IC <sub>50</sub> (W2) (nM)
<b>5d</b>	NI <sup>b</sup>	259
<b>5f</b>	NI <sup>b</sup>	273
<b>5h</b>	NI <sup>b</sup>	369
<b>5i</b>	500	160
<b>5j</b>	NI <sup>b</sup>	525
<b>5k</b>	NI <sup>b</sup>	226
<b>5n</b>	500	55.4
<b>5u</b>	1000	99.7
<b>5v</b>	1000	631
chloroquine	125	186
gentamicin	NI <sup>b</sup>	ND <sup>c</sup>

<sup>a</sup>The inhibition of hemozoin-like crystals formation was tested in the presence of 0–1000 μM of each compound. <sup>b</sup>NI: no inhibition of hemozoin-like crystal formation. <sup>c</sup>ND: not determined.

compared to chloroquine, thus indicating that this is not the main mechanism of action of **5** against erythrocytic parasites.

**Activity against the Mitochondrial Electron Transport Chain.** Quinolone-4(1H)-imines **5** are structurally related to dihydroacridinedione **12** (WR 243251, Figure 7), a potent blood schizonticidal agent.<sup>37,38</sup> Mechanistic studies suggested that dihydroacridinedione **12** targets the parasite mitochondrial electron transport chain (mtETC),<sup>39</sup> which is responsible for maintaining a constant pool of ubiquinone for the last step of pyrimidine biosynthesis, catalyzed by dihydroorotate dehydrogenase (DHODH).<sup>40</sup> The ketone hydrolysis product, a potential metabolite of **12**, appeared to target the Q<sub>o</sub> quinol oxidation site of the cytochrome *bc*<sub>1</sub> complex, an essential component of the mtETC.<sup>41</sup> A similar mode of action has been reported for the closely related class of antiparasitodal 4(1H)-quinolones<sup>16,42,43</sup> and 4(1H)-pyridones<sup>44</sup> (e.g., **13** and **14**, respectively). In order to investigate whether the antiparasitodal mode of action of quinolone-4(1H)-imines involved inhibition of the parasite's *bc*<sub>1</sub> complex, we screened compounds **5b**, **5c**, **5l**, and **5r** using a phenotypic assay based on a *P. falciparum* 3D7 cell line transfected with yeast DHODH.<sup>45</sup> This cell line, which uses fumarate instead of ubiquinone as the final electron acceptor, has been shown previously to be resistant to mtETC inhibitors.<sup>46</sup> The results presented in Table 3 indicate that **5b**, **5c**, **5l**, and **5r** display similar antiparasitodal activity against both 3D7-yDHODH and parental 3D7 strains, suggesting that inhibition of the *bc*<sub>1</sub> complex is not the primary antimalarial mode of action for quinolone-4(1H)-imines **5**. This result was further supported by the observation that compound **5r** did not

**Table 3. Growth Inhibition of Parental (3D7) and Transgenic (3D7-yDHODH) *P. falciparum* Strains with Quinolone-4(1H)-imines **5b**, **5c**, **5l**, and **5r****

<i>P. falciparum</i> strain	IC <sub>50</sub> ± SD (nM)			
	<b>5b</b>	<b>5c</b>	<b>5l</b>	<b>5r</b>
3D7	177 ± 14	73.7 ± 2.9	136 ± 19	64.7 ± 1.9
3D7-yDHODH	186 ± 42	52.3 ± 3.5	195 ± 82	68.3 ± 1.7

inhibit *bc*<sub>1</sub> complex activity at ≤10 μM (measured as ubiquinol/cyt c reductase), from *P. falciparum* cell-free extracts.

**Activity against the Liver Stage of Infection.** Quinolone-4(1H)-imines **5** were also evaluated for their antiparasitodal activity against liver stages of the rodent parasite *P. berghei* and for cytotoxicity to Huh-7 human hepatoma cells, employing methods that were previously reported.<sup>47</sup> Primaquine was also included (1 and 10 μM) as a positive control for liver stage activity. Remarkably, nine compounds were more potent than primaquine and were nontoxic to Huh-7 human hepatoma cells at concentrations up to 5 μM. These compounds were then submitted to a dose–effect study, and the resulting IC<sub>50</sub> values for the inhibition of hepatic *P. berghei* infection ranged from 0.44 to 4.6 μM, which compare favorably with the IC<sub>50</sub> value of 7.5 μM determined for primaquine (Table 1). Notably, the most active compounds **5o** and **5p** (IC<sub>50</sub> values of 0.44 and 0.71 μM, respectively), which have heterocyclic moieties in position C-7 of the quinolinimine scaffold, were at least 10-fold more potent than primaquine, establishing these novel quinolinimine derivatives as promising dual-stage antimalarials. Currently, the mechanism of action for quinolone-4(1H)-imines **5o** and **5p** is unknown, but in contrast to their quinolone counterparts (e.g., decoquinatone, **13**), it is unlikely that they target the parasite mtETC,<sup>16,42,45</sup> as described in the previous section.

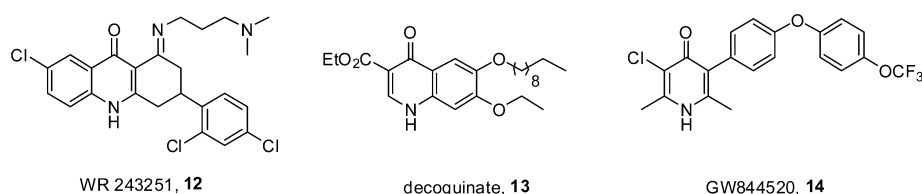
**Metabolic and Chemical Stabilities.** The microsomal stability of a selected set of quinolone-4(1H)-imines was determined using rat liver microsomes. Inspection of Table 4

**Table 4. Results from the in Vitro Metabolism Studies Using Rat Liver Microsomes<sup>a</sup>**

compd	% remaining	compd	% remaining
<b>5a</b>	68.0	<b>5l</b>	65.0
<b>5i</b>	73.0	<b>5r</b>	62.7
<b>5j</b>	80.4	<b>5t</b>	81.5
<b>5k</b>	79.0	<b>5u</b>	75.0

<sup>a</sup>Data present the percentage of remaining compound after 6 h of incubation with microsomes in the presence of the NADPH-regenerating system.

reveals that *N*-alkylaminequinolone-4(1H)-imines **5** display excellent metabolic stability, with most of the compounds



**Figure 7.** Chemical structures of *Plasmodium falciparum* *bc*<sub>1</sub> complex inhibitors containing dihydroacridinedione (**12**), 4(1H)-quinolone (**13**), and 4(1H)-pyridone (**14**) cores.

presenting negligible degradation after 6 h of incubation, in contrast with the previously reported *N*-alkyl counterparts (e.g., 3, Figure 1), which were degraded in rat liver microsomes with half-lives of ~4 h.<sup>24</sup> These results also suggest that the rate of degradation is not significantly affected by the length of the aminoalkyl chain (e.g., 5j vs 5t) or by the nature of substituents at the quinolon-4(1*H*)-imine moiety (e.g., 5r vs 5t). A similar result was observed when acyclic terminal amines were replaced by cyclic amines (e.g., 5j vs 5k). None of the selected compounds showed any degradation in the control experiments (with the NADPH-regenerating system absent), suggesting that there was no major noncofactor dependent metabolism contributing to their degradation in liver microsomes. Furthermore, compound 5u showed no significant degradation when incubated in pH 7.4 and 0.3 aqueous buffers at 37 °C for 10 days, suggesting that the *N*-alkylamine-quinolon-4(1*H*)-imines are stable compounds, in contrast to their *N*-Mannich-base counterparts.<sup>18</sup>

The MS scan data from the incubation mixtures of compound 5u in microsomes were screened for the presence of fragments corresponding to the putative metabolites (see Supporting Information). The reaction profile of 5u revealed the formation of the corresponding quinoline as the major metabolite, suggesting that *N*-dealkylation is the predominant pathway.

## CONCLUSION

We report that quinolon-4(1*H*)-imines 5 bearing an alkylamine side-chain at N-1 are a new family of efficient dual-stage antiparasitic agents endowed with chemical and metabolic stability. Compounds 5 inhibited the development of intra-erythrocytic forms of *P. falciparum* with IC<sub>50</sub> values in the nanomolar range and were associated with low cytotoxicity against HEK293T mammalian cells. The length of the side chain between N-1 and the distal amine seems to be critical for activity, with side chains with three and four carbon atoms being most active. Lipophilic substituents in the iminoaryl moiety improve potency, while strong electron-withdrawing substituents at C-6 and C-7 of the quinolonimine moiety were detrimental to activity against the erythrocytic stage parasites. In spite of structural resemblance of compounds 5 to antimalarial 4-aminoquinolines, which includes the presence of two basic groups that can lead to concentration in the acidic DV of the parasite, the primary mechanism of action of quinolon-4(1*H*)-imines 5 does not appear to involve inhibition of heme crystallization. In addition, a phenotypic assay based on a *P. falciparum* cell line transfected with cytoplasmic yeast DHODH suggested that inhibition of the bc<sub>1</sub> complex is not the primary antimalarial mode of action for quinolon-4(1*H*)-imines 5. Additional studies on the mechanism of action of new quinolon-4(1*H*)-imines are underway.

Quinolon-4(1*H*)-imines 5 were also active against the liver stage of infection. Derivative 5p was the most promising compound, with IC<sub>50</sub> values of 54 and 710 nM against the erythrocytic and liver stages of infection, respectively, with minimal toxicity against human cells. Importantly, compounds 5 displayed considerable stability toward hepatic enzymes and aqueous buffers, supporting the conclusion that extending the linker between N-1 and the nitrogen atom is an effective approach to remove the source of reactivity of their *N*-Mannich-base and *N*-alkyl counterparts, 2 and 3, respectively. Overall, our study reveals that quinolon-4(1*H*)-imines such as

5p are a good starting point to exploit for lead optimization toward developing dual-stage antimalarials.

## EXPERIMENTAL SECTION

**Chemistry.** All manipulations requiring anhydrous conditions were carried out in flame-dried glassware, with magnetic stirring and under a nitrogen atmosphere. Chemicals and anhydrous solvents were obtained from commercial sources (Sigma-Aldrich or Alfa Aesar) and were used as received. 4,6-Dichloroquinoline (6c) and 4-chloro-6-(trifluoromethyl)quinolone (6d) were prepared according to literature procedures, and their analytical data were in agreement with those already published<sup>26,27</sup> (see Supporting Information). Analytical TLC plates, aluminum sheets with silica gel F250 (Merck), were visualized by UV light (254 or 366 nm) or stained with KMnO<sub>4</sub> or with a solution of ninhydrin in ethanol. Flash chromatography was performed on Kieselgel 60 GF<sub>254</sub> silica (Merck) of 0.040–0.063 mm.

Melting points were determined on a Kofler melting point apparatus. NMR spectra were recorded on a Bruker 400 Ultra-Shield (<sup>1</sup>H, 400.13 MHz; <sup>13</sup>C, 100.61 MHz). Data are reported as follows: chemical shift, multiplicity (s, singlet; d, doublet; t, triplet; dd, doublet of doublets; dt, doublet of triplets; q, quartet; m, multiplet; br, broad), coupling constants (*J* in Hz), integration, and assignment. Chemical shifts are given in parts per million (ppm) with the solvent signal as internal standard [CDCl<sub>3</sub> δ (<sup>1</sup>H) 7.26 ppm and δ (<sup>13</sup>C) 77.2 ppm, and CD<sub>3</sub>OD δ (<sup>1</sup>H) 4.87 ppm and δ (<sup>13</sup>C) 49.0 ppm]. High resolution mass spectrometry (HRMS) was performed on a Bruker MicrOTOF equipped with ESI ion source from the Mass Spectrometry and Proteomics Unity of the University of Santiago de Compostela, Spain. To determine the purity of the final compounds (5a–v), HPLC experiments were conducted using an ELITE LaChrom VWR HITACHI equipment (pump + controller L-2130, UV detector L-2400) and a column LiChroCART, RP-18e, 5 μm. All quinolon-4(1*H*)-imines tested in biological assays were ≥95% pure. Conditions and retention times are described in the Supporting Information.

**General Procedure A for *N*-Alkylated Derivatives (5a–l, 5u, 5v).** To a solution of the corresponding quinolin-4-amine in anhydrous DMF (3.0 mL/mmol), under N<sub>2</sub> atmosphere, was slowly added NaH (4.0 equiv, 40% dispersion in oil) at room temperature. The mixture was stirred until evolution of hydrogen ceased (10–60 min). The desired alkylamine chloride reagent (1.5 equiv) and NaI (3.0 equiv) were added, and the mixture was stirred at 80 °C for 5–12 h. The mixture was then concentrated under reduced pressure, diluted with DCM, and washed with brine. The aqueous phase was extracted with DCM (3 × 50 mL), and the combined organic phases were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The crude product was then purified by flash chromatography (DCM/MeOH/TEA, 9:0.9:0.1) and recrystallized from different systems (e.g., DCM/MeOH) to afford the final pure product.

**General Procedure B for *N*-Alkylated Derivatives (5q–t).** To a solution of the corresponding quinolin-4-amine in anhydrous DMF (3 mL/mmol), under N<sub>2</sub> atmosphere, was slowly added NaH (4 equiv, 40% dispersion in oil) at room temperature. The mixture was stirred until evolution of hydrogen ceased (10–60 min). The desired alkyl dibromide reagent (1.5 equiv) was then added, and the mixture was stirred at room temperature. The mixture was then concentrated under reduced pressure, diluted with DCM, and washed with brine. The aqueous phase was extracted with DCM (3 × 50 mL), and the combined organic phases were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The resulting product and NaI (1.5 equiv) were then dissolved in DEA (15 mL/mmol) and stirred at room temperature for 78 h. The mixture was concentrated under reduced pressure and the crude product was purified by flash chromatography (DCM/MeOH/Et<sub>3</sub>N, 9:0.9:0.1) and recrystallized from different systems (e.g., DCM/MeOH) to afford the final pure product.

**General Procedure for Suzuki Coupling (5m–p).** To a solution of the aryl halide in dry 1,4-dioxane at room temperature was consecutively added PdCl<sub>2</sub>(Ph<sub>3</sub>P)<sub>2</sub> (0.1 equiv), *t*-Bu-Xphos (0.1 equiv), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M (3 equiv), and boric acid (1.2 equiv). After degassing for 5 min, the resulting mixture was heated at 100 °C under

N<sub>2</sub> atmosphere overnight. The mixture was then cooled to room temperature, diluted with DCM, and filtered through a pad of Celite. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the crude product was purified by thin layer chromatography (DCM/MeOH/Et<sub>3</sub>N, 95:4:1) to afford the corresponding 7-substituted quinolin-4-imines.

**(E)-N-(7-Chloro-1-(2-(diethylamino)ethyl)quinolin-4(1H)-ylidene)biphenyl-4-amine (5a).** According to general procedure A, the product was obtained as a yellow solid (37 mg, 11%). Mp 115–117 °C. <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ 8.68 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.43 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.37 (s, 1H), 7.90–7.86 (m, 3H), 7.72–7.70 (m, 2H), 7.58–7.56 (m, 2H), 7.52–7.49 (m, 2H), 7.43–7.41 (m, 1H), 6.98 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.66 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 2.90 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 2.58–2.53 (m, 4H), 0.87–0.83 (m, 6H). <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ 154.3, 148.4, 140.8, 139.3, 135.9, 128.7, 128.3, 127.7, 127.6, 126.6, 125.7, 125.5, 117.9, 99.9, 53.3, 51.2, 46.9, 10.9. HRMS (ESI) *m/z* calcd for [C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>ClN<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 430.2045 [*M* + H<sup>+</sup>]; found, 430.2032.

**(E)-N-(7-Chloro-1-(2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl)quinolin-4(1H)-ylidene)biphenyl-4-amine (5b).** According to general procedure A, the product was obtained as a yellow solid (49 mg, 39%). Mp 221–224 °C. <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ 8.56 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.71–7.55 (m, 4H), 7.45 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.38–7.21 (m, 3H), 7.02 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.92 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.02 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 3.99 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.86 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.60 (d, *J* = 5.3 Hz, 4H), 1.91–1.73 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ 154.6, 152.4, 141.6, 140.2, 140.0, 137.4, 135.3, 129.0, 128.4, 128.2, 127.0, 126.9, 124.3, 124.0, 122.1, 114.4, 101.7, 54.9, 54.3, 51.8, 23.9. HRMS (ESI) *m/z* calcd for [C<sub>27</sub>H<sub>27</sub>ClN<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 428.1888 [*M* + H<sup>+</sup>]; found, 428.1898.

**(E)-N-(7-Chloro-1-(3-(piperidin-1-yl)propyl)quinolin-4(1H)-ylidene)biphenyl-4-amine (5c).** According to general procedure A, the product was obtained as a yellow solid (50 mg, 48%). Mp 176–178 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 8.56 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.67–7.57 (m, 4H), 7.46 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.35–7.20 (m, 3H), 7.06–6.95 (m, 3H), 6.00 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 3.98 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.37 (br, 4H), 2.31 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.97–1.91 (m, 2H), 1.65–1.56 (m, 4H), 1.47 (br, 2H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 154.4, 152.2, 141.3, 140.0, 137.1, 134.9, 128.7, 128.0, 127.9, 126.9, 127.0, 127.0, 124.1, 123.6, 121.8, 114.4, 101.0, 54.9, 54.5, 49.6, 26.1, 25.6, 24.5. HRMS (ESI) *m/z* calcd for [C<sub>29</sub>H<sub>31</sub>ClN<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 456.2201 [*M* + H<sup>+</sup>]; found, 456.2199.

**(E)-4-Chloro-N-(7-chloro-1-(3-(piperidin-1-yl)propyl)quinolin-4(1H)-ylidene)aniline (5d).** According to general procedure A, the product was obtained as a yellow solid (205 mg, 34%). Mp 157–159 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 8.55 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.36 (s, 1H), 7.33–7.20 (m, 3H), 7.06 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.96–6.83 (m, 2H), 5.90 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.00 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.36 (br, 4H), 2.30 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.93 (dt, *J* = 13.1, 6.5 Hz, 2H), 1.62 (dt, *J* = 10.9, 5.5 Hz, 4H), 1.47 (br, 2H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 154.8, 148.9, 140.4, 139.8, 137.4, 129.3, 128.0, 127.3, 123.9, 123.4, 123.0, 114.5, 100.6, 54.8, 54.5, 49.7, 26.1, 25.5, 24.5. HRMS (ESI) *m/z* calcd for [C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 414.1498 [*M* + H<sup>+</sup>]; found, 414.1497.

**(E)-4-Bromo-N-(7-chloro-1-(3-(piperidin-1-yl)propyl)quinolin-4(1H)-ylidene)aniline (5e).** According to general procedure A, the product was obtained as a yellow solid (133 mg, 29%). Mp 165–167 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 8.55 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.49–7.40 (m, 2H), 7.36 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.31–7.21 (m, 1H), 7.06 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.85 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 5.90 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.00 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.36 (br, 4H), 2.29 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.96–1.91 (m, 2H), 1.69–1.56 (m, 4H), 1.47 (br, 2H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 154.7, 140.5, 139.8, 137.4, 132.3, 128.0, 123.9, 123.5, 114.9, 114.6, 100.6, 54.8, 54.5, 49.7, 26.1, 25.5, 24.5. HRMS (ESI) *m/z* calcd for [C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>BrClN<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 460.0973 [*M* + H<sup>+</sup>]; found, 460.0965.

**(E)-N-(7-Chloro-1-(3-(piperidin-1-yl)propyl)quinolin-4(1H)-ylidene)aniline (5f).** According to general procedure A, the product was obtained as a yellow solid (133 mg, 40%). Mp 137–139 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 8.55 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.41–7.32 (m, 3H), 7.24 (dd, *J* = 8.7, 1.9 Hz, 1H), 7.09–7.03 (m, 1H), 7.02–6.87 (m, 3H), 5.91 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 3.97 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.39 (br, 4H), 2.29 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.00–1.83 (m, 2H), 1.69–1.54 (m, 4H), 1.46 (br, 2H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 154.4, 140.0, 137.0, 129.3, 127.9, 123.8, 123.6, 122.2, 121.5, 114.4, 100.9, 54.8, 54.5, 49.5, 26.1, 25.5, 24.5.

HRMS (ESI) *m/z* calcd for [C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>ClN<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 380.1888 [*M* + H<sup>+</sup>]; found, 380.1881.

**(E)-N-(7-Chloro-1-(3-(piperidin-1-yl)propyl)quinolin-4(1H)-ylidene)-4-methylaniline (5g).** According to general procedure A, the product was obtained as a yellow solid (30 mg, 20%). Mp 164–166 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 8.59 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.33 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.24 (dd, *J* = 8.4, 1.7 Hz, 1H), 7.16 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 6.99 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.87 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 5.96 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 3.98 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.36 (br, 4H), 2.36 (br, 3H), 2.29 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.95–1.89 (m, 2H), 1.67–1.54 (m, 4H), 1.46 (br, 2H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 154.4, 140.0, 139.9, 137.1, 131.7, 130.0, 128.0, 123.7, 121.4, 114.4, 100.9, 54.8, 54.5, 49.6, 26.1, 25.5, 24.4, 20.9. HRMS (ESI) *m/z* calcd for [C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>ClN<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 394.2045 [*M* + H<sup>+</sup>]; found, 394.2040.

**(E)-N-(7-Chloro-1-(3-(piperidin-1-yl)propyl)quinolin-4(1H)-ylidene)-4-fluoroaniline (5h).** According to general procedure A, the product was obtained as a yellow solid (38 mg, 15%). Mp 123–125 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 8.55 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.32–7.18 (m, 1H), 7.06–7.02 (m, 3H), 6.89 (dd, *J* = 7.6, 5.2 Hz, 2H), 5.90 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 3.99 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.36 (br, 4H), 2.30 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.04–1.85 (m, 2H), 1.64–1.59 (m, 4H), 1.47 (br, 2H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 160.0, 157.6, 154.9, 140.2, 139.9, 137.2, 127.9, 123.8, 123.4, 122.6, 115.7, 114.5, 100.6, 54.8, 54.5, 49.6, 26.1, 25.5, 24.5. HRMS (ESI) *m/z* calcd for [C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>ClFN<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 398.1794 [*M* + H<sup>+</sup>]; found, 398.1788.

**(E)-N-(7-Chloro-1-(3-(piperidin-1-yl)propyl)quinolin-4(1H)-ylidene)-4-phenoxyaniline (5i).** According to general procedure A, the product was obtained as a yellow solid (42 mg, 21%). Mp 154–156 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 8.84 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.49 (s, 1H), 7.45–7.31 (m, 4H), 7.17–6.95 (m, 7H), 6.19 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 4.15 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.36 (br, 4H), 2.30 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.05–1.89 (m, 2H), 1.69–1.55 (m, 4H), 1.47 (br, 2H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 157.8, 154.8, 153.2, 141.8, 139.7, 138.3, 129.7, 128.4, 124.9, 123.9, 122.9, 122.0, 120.2, 118.3, 115.0, 100.7, 54.7, 54.5, 50.4, 26.1, 25.6, 24.4. HRMS (ESI) *m/z* calcd for [C<sub>29</sub>H<sub>31</sub>ClN<sub>3</sub>O]<sup>+</sup>, 472.2150 [*M* + H<sup>+</sup>]; found, 472.2159.

**(E)-N-(1-(2-(Diethylamino)ethyl)-7-(trifluoromethyl)quinolin-4(1H)-ylidene)biphenyl-4-amine (5j).** According to general procedure A, the product was obtained as a yellow solid (97 mg, 21%). Mp 148–150 °C. <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ 8.94 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.71 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.55 (s, 1H), 8.15 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.89–7.87 (m, 2H), 7.72–7.70 (m, 2H), 7.66–7.62 (m, 2H), 7.52–7.48 (m, 2H), 7.42–7.40 (m, 1H), 7.11 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.29 (br, 2H), 3.54 (br, 2H), 3.19 (br, 2H), 1.26 (br, 6H). <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ 155.7, 148.8, 141.3, 139.6, 135.5, 128.7, 128.4, 127.6, 126.6, 126.2, 125.6, 123.0, 120.9, 115.6, 101.7, 49.9, 48.1, 47.0, 18.8. HRMS (ESI) *m/z* calcd for [C<sub>28</sub>H<sub>29</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 464.2308 [*M* + H<sup>+</sup>]; found, 464.2315.

**(E)-N-(1-(2-(Pyrrolidin-1-yl)ethyl)-7-(trifluoromethyl)quinolin-4(1H)-ylidene)biphenyl-4-amine (5k).** According to general procedure A, the product was obtained as a yellow solid (37 mg, 30%). Mp 238–240 °C. <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ 8.92 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 8.72 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 8.55 (s, 1H), 8.13 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.70 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.63 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.49 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.40 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.09 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.99 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.39 (br, 2H), 3.01 (br, 4H), 1.95 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ 155.6, 148.6, 141.5, 139.6, 138.3, 135.7, 135.3, 128.7, 128.3, 127.6, 126.6, 126.1, 125.6, 124.6, 122.9, 115.8, 101.6, 54.0, 53.2, 52.0, 23.0. HRMS (ESI) *m/z* calcd for [C<sub>28</sub>H<sub>27</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 462.2152 [*M* + H<sup>+</sup>]; found, 462.2146.

**(E)-N-(1-(3-(Piperidin-1-yl)propyl)-7-(trifluoromethyl)quinolin-4(1H)-ylidene)biphenyl-4-amine (5l).** According to general procedure A, the product was obtained as a yellow solid (33 mg, 21%). Mp 174–177 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 8.74 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.68–7.58 (m, 4H), 7.56–7.49 (m, 2H), 7.49–7.41 (m, 2H), 7.36–7.30 (m, 1H), 7.12–6.99 (m, 3H), 6.05 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.06 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.36 (br, 2H), 2.32 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.98–1.92 (m, 2H), 1.64–1.55 (m, 4H), 1.47 (br, 2H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 154.2, 152.0, 141.2, 140.4, 138.2, 135.1, 132.7, 132.4, 128.7, 128.0, 127.6, 126.7, 126.6, 125.3, 123.0, 122.6, 121.6, 119.3, 111.8, 111.8,

101.2, 54.9, 54.5, 49.6, 26.1, 25.4, 24.5. HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for  $[C_{30}H_{31}F_3N_3]^+$ , 490.2465  $[M + H]^+$ ; found, 490.2465.

**(E)-N-(7-(4-Fluorophenyl)-1-(3-(piperidin-1-yl)propyl)-quinolin-4(1H)-ylidene)aniline (5m).** Yellow solid (32 mg, 80%). Mp 132–134 °C.  $^1H$  NMR ( $CD_3OD$ )  $\delta$  8.68 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H), 8.49 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 1H), 8.28 (s, 1H), 8.10 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H), 7.97–7.89 (m, 2H), 7.62–7.54 (m, 2H), 7.50–7.42 (m, 3H), 7.31 (t,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 6.84 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 1H), 4.74 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 2H), 2.65–2.30 (m, 6H), 2.24–2.15 (m, 2H), 1.57–1.48 (m, 4H), 1.43 (br, 2H).  $^{13}C$  NMR ( $CD_3OD$ )  $\delta$  165.1, 156.9, 148.6, 147.7, 140.4, 138.4, 136.1, 131.4, 131.1, 129.3, 127.7, 126.7, 125.9, 118.9, 117.3, 116.7, 101.4, 56.1, 55.4, 54.0, 26.7, 26.3, 24.8. HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for  $[C_{29}H_{31}FN_3]^+$ , 440.2497  $[M + H]^+$ ; found, 440.2498.

**(E)-N-(7-(4-Fluorophenyl)-1-(3-(piperidin-1-yl)propyl)-quinolin-4(1H)-ylidene)-[1,1'-biphenyl]-4-amine (5n).** Yellow solid (52 mg, 76%). Mp 158–160 °C.  $^1H$  NMR ( $CD_3OD$ )  $\delta$  8.73 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H), 8.54 (d,  $J$  = 7.4 Hz, 1H), 8.33 (s, 1H), 8.15 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H), 8.00–7.93 (m, 2H), 7.87 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 7.71 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 2H), 7.58 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H), 7.50 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 2H), 7.44–7.32 (m, 3H), 6.98 (d,  $J$  = 7.4 Hz, 1H), 4.78 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 2H), 2.52–2.32 (m, 6H), 2.26–2.16 (m, 2H), 1.58–1.50 (m, 4H), 1.46 (br, 2H).  $^{13}C$  NMR ( $CD_3OD$ )  $\delta$  165.4, 157.1, 148.8, 148.0, 142.6, 141.4, 140.7, 137.8, 136.4, 131.4, 130.4, 130.0, 129.2, 128.2, 128.0, 127.2, 126.2, 119.2, 117.5, 116.9, 101.8, 56.1, 55.4, 54.1, 26.7, 26.2, 24.7. HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for  $[C_{35}H_{33}FN_3]^+$ , 516.2810  $[M + H]^+$ ; found, 516.2800.

**(E)-4-([1,1'-Biphenyl]-4-ylimino)-1-(3-(piperidin-1-yl)propyl)-N-(pyridin-2-yl)-1,4-dihydroquinolin-7-amine (5o).** Yellow solid (16 mg, 24%). Mp 172–174 °C.  $^1H$  NMR ( $CD_3OD$ )  $\delta$  9.21 (s, 1H), 8.46 (d,  $J$  = 9.3 Hz, 1H), 8.40 (d,  $J$  = 4.3 Hz, 1H), 8.36 (d,  $J$  = 7.4 Hz, 1H), 7.82 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 7.77–7.66 (m, 4H), 7.53 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 7.48 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 2H), 7.39 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 1H), 7.11–6.95 (m, 2H), 6.81 (d,  $J$  = 7.4 Hz, 1H), 4.58 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 2H), 2.73–2.58 (m, 2H), 2.55 (br, 4H), 2.39–2.23 (m, 2H), 1.66–1.54 (m, 4H), 1.48 (br, 2H).  $^{13}C$  NMR ( $CD_3OD$ )  $\delta$  156.4, 155.7, 148.9, 148.5, 147.3, 141.9, 141.2, 139.2, 137.8, 130.1, 129.6, 128.9, 128.0, 126.9, 125.6, 120.6, 118.1, 113.9, 113.2, 102.7, 100.3, 56.5, 55.3, 54.3, 26.2, 25.8, 24.8. HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for  $[C_{34}H_{36}N_5]^+$ , 514.2965  $[M + H]^+$ ; found, 514.2966.

**(E)-N-(1'-(3-(Piperidin-1-yl)propyl)-[3,7'-biquinolin]-4(1'H)-ylidene)-[1,1'-biphenyl]-4-amine (5p).** Orange solid (69 mg, 62%). Mp 152–154 °C.  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ ) 9.23 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H), 8.86 (d,  $J$  = 7.1 Hz, 1H), 8.40 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H), 8.18 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.94 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H), 7.77 (t,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.70–7.58 (m, 7H), 7.43 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 2H), 7.31 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 1H), 7.18 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 1H), 7.11 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 6.12 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 1H), 4.16 (t,  $J$  = 6.3 Hz, 2H), 2.42–2.26 (m, 6H), 2.05–1.97 (m, 2H), 1.55–1.47 (m, 4H), 1.44–1.34 (br, 2H).  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  155.0, 149.7, 147.8, 141.2, 140.9, 140.9, 139.6, 135.4, 135.2, 134.0, 133.2, 130.0, 129.4, 128.8, 128.2, 128.0, 127.7, 127.4, 126.8, 126.7, 124.6, 123.0, 122.4, 113.5, 100.8, 55.0, 54.9, 50.1, 26.1, 25.7, 24.5. HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for  $[C_{38}H_{37}N_4]^+$ , 549.3013  $[M + H]^+$ ; found, 549.3003.

**(E)-N-(7-Chloro-1-(3-(diethylamino)propyl)quinolin-4(1H)-ylidene)biphenyl-4-amine (5q).** According to general procedure B, the product was obtained as a yellow solid (16 mg, 8%). Mp 95–98 °C.  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  8.68 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 1H), 7.73–7.52 (m, 4H), 7.52–7.41 (m, 3H), 7.41–7.22 (m, 2H), 7.17–7.05 (m, 3H), 6.09 (d,  $J$  = 7.7 Hz, 1H), 4.02 (t,  $J$  = 6.6 Hz, 2H), 2.56 (dd,  $J$  = 14.1, 7.0 Hz, 4H), 2.47 (t,  $J$  = 6.2 Hz, 2H), 1.98–1.84 (m, 2H), 1.10–0.94 (m, 6H).  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  154.6, 141.4, 140.6, 139.7, 137.6, 128.7, 128.2, 128.0, 126.7, 124.0, 122.2, 119.9, 114.6, 101.0, 50.3, 49.3, 46.4, 26.2, 11.5. HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for  $[C_{28}H_{31}ClN_3]^+$ , 444.2201  $[M + H]^+$ ; found, 444.2200.

**(E)-N-(7-Chloro-1-(4-(diethylamino)butyl)quinolin-4(1H)-ylidene)biphenyl-4-amine (5r).** According to general procedure B, the product was obtained as a yellow solid (34 mg, 12%). Mp 108–110 °C.  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  8.59 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H), 7.72–7.57 (m, 4H), 7.52–7.40 (m, 2H), 7.37–7.33 (m, 2H), 7.29–7.24 (m, 2H), 7.04 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H), 6.93 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H), 6.03 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H),

3.99–3.83 (m, 2H), 2.55 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 4H), 2.48 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 1.84 (dt,  $J$  = 15.0, 7.6 Hz, 2H), 1.63–1.52 (m, 2H), 1.12–0.97 (m, 6H).  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  154.4, 151.6, 141.2, 139.7, 137.2, 135.1, 132.7, 128.7, 128.1, 127.9, 126.7, 126.6, 123.8, 121.9, 114.5, 101.2, 52.4, 52.1, 46.8, 26.4, 24.4, 11.6. HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for  $[C_{29}H_{33}ClN_3]^+$ , 458.2358  $[M + H]^+$ ; found, 458.2360.

**(E)-N-(1-(3-(Diethylamino)propyl)-7-(trifluoromethyl)-quinolin-4(1H)-ylidene)biphenyl-4-amine (5s).** According to general procedure B, the product was obtained as a yellow solid (34 mg, 4%). Mp 97–99 °C.  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  9.28 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.77–7.71 (m, 2H), 7.63–7.58 (m, 4H), 7.47–7.38 (m, 2H), 7.36–7.31 (m, 3H), 6.63 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 1H), 4.43 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 2H), 2.68–2.67 (m, 4H), 2.61 (t,  $J$  = 6.4 Hz, 2H), 2.08 (t,  $J$  = 6.4 Hz, 2H), 1.09–1.05 (m, 6H).  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  154.8, 146.4, 140.1, 139.6, 138.0, 129.0, 128.4, 127.8, 126.8, 124.9, 124.3, 122.8, 121.8, 114.2, 101.6, 52.1, 49.0, 46.7, 26.1, 10.3. HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for  $[C_{29}H_{31}F_3N_3]^+$ , 478.2465  $[M + H]^+$ ; found, 478.2470.

**(E)-N-(1-(4-(Diethylamino)butyl)-7-(trifluoromethyl)-quinolin-4(1H)-ylidene)biphenyl-4-amine (5t).** According to general procedure B, the product was obtained as a yellow solid (74 mg, 15%). Mp 135–137 °C.  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  8.74 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H), 7.79–7.57 (m, 4H), 7.55–7.49 (m, 2H), 7.45 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 2H), 7.33 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 1H), 7.03 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H), 6.96 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H), 6.05 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H), 3.97 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 2H), 2.54 (dd,  $J$  = 14.2, 7.1 Hz, 4H), 2.48 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 2H), 1.85 (dt,  $J$  = 14.6, 7.3 Hz, 2H), 1.59 (dd,  $J$  = 14.2, 7.1 Hz, 2H), 1.04 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 6H).  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  154.1, 151.9, 141.2, 139.8, 138.5, 135.2, 132.7, 128.7, 128.0, 127.6, 126.7, 126.6, 125.3, 121.6, 119.4, 111.7, 101.6, 52.4, 52.1, 46.8, 26.5, 24.5, 11.5. HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for  $[C_{30}H_{33}F_3N_3]^+$ , 492.2621  $[M + H]^+$ ; found, 492.2629.

**(E)-N-(6-Chloro-1-(3-(piperidin-1-yl)propyl)quinolin-4(1H)-ylidene)biphenyl-4-amine (5u).** According to general procedure A, the product was obtained as a yellow solid (128 mg, 43%). Mp 48–50 °C.  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  8.66 (s, 1H), 7.70–7.52 (m, 4H), 7.53–7.40 (m, 3H), 7.38–7.24 (m, 2H), 7.12–6.98 (m, 3H), 6.03 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H), 4.02 (t,  $J$  = 6.4 Hz, 2H), 2.36 (br, 4H), 2.30 (t,  $J$  = 6.4 Hz, 2H), 1.93 (dd,  $J$  = 12.6, 6.4 Hz, 2H), 1.67–1.53 (m, 4H), 1.47 (br, 2H).  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  154.2, 151.5, 141.2, 140.2, 137.5, 135.1, 131.0, 129.4, 128.7, 127.9, 126.7, 126.6, 126.5, 125.8, 121.9, 116.4, 100.6, 54.8, 54.5, 49.8, 26.1, 25.6, 24.4. HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for  $[C_{29}H_{31}ClN_3]^+$ , 456.2201  $[M + H]^+$ ; found, 456.2207.

**(E)-N-(1-(3-(Piperidin-1-yl)propyl)-6-(trifluoromethyl)-quinolin-4(1H)-ylidene)biphenyl-4-amine (5v).** According to general procedure A, the product was obtained as a yellow solid (47 mg, 12%). Mp 85–87 °C.  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  8.93 (s, 1H), 7.74 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 1H), 7.70–7.56 (m, 4H), 7.52–7.39 (m, 3H), 7.39–7.26 (m, 1H), 7.04 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 3H), 6.05 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H), 4.04 (t,  $J$  = 6.5 Hz, 2H), 2.37 (br, 4H), 2.32 (t,  $J$  = 6.5 Hz, 2H), 2.02–1.88 (m, 2H), 1.66–1.54 (m, 4H), 1.47 (br, 2H).  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  154.2, 151.8, 141.2, 140.2, 135.1, 128.7, 126.7, 125.5, 125.3, 125.3, 124.2, 121.7, 115.2, 101.6, 54.8, 54.5, 49.7, 26.1, 25.4, 24.4. HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for  $[C_{30}H_{31}F_3N_3]^+$ , 490.2465  $[M + H]^+$ ; found, 490.2473.

**In Vitro Cytotoxicity.** The cytotoxicity was assessed using general cell viability end point MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide). Briefly, the day before experiment, cells HEK293T (human embryonic kidney epithelial cell line, ATCC CRL-11268) were seeded in 96-well tissue culture plates, in RPMI 1640 culture medium supplemented with 10% fetal serum bovine, 100 units of penicillin G (sodium salt), 100  $\mu$ g/mL streptomycin sulfate, and 2 mM L-glutamine, at a concentration that allowed cells to grow exponentially during the time of the assay. Compounds to be tested were diluted in DMSO and then serially diluted in the culture medium. Compounds at different concentrations and DMSO were then added to the cells, which were incubated at 37 °C in humidified 5%  $CO_2$  atmosphere. After 48 h, cell medium containing DMSO (for control cells) or tested compound solution (for test cells) was removed and replaced with fresh medium containing MTT dye. After 3 h of incubation the complete medium was removed and the intracellular formazan crystals were solubilized and extracted with DMSO. After 15 min at room temperature the absorbance was measured at 570 nm in a

microplate reader. The percentage of cell viability was determined for each concentration of tested compound as described previously. The concentration of a compound reflecting a 50% inhibition of cell viability (i.e.,  $EC_{50}$ ) was determined from the concentration–response curve, applying a nonlinear regression procedure to the concentration response data using GraphPad Prism software.

**In Vitro Blood Stage Activity Assays.** Human red blood cells infected with 1% ring-stage *P. falciparum* strains synchronized with 5% sorbitol were incubated with tested compounds in 96-well plates at 37 °C for 48 h in RPMI-1640 medium, supplemented with 25 mM HEPES, pH 7.4, 10% heat inactivated human serum (or 0.5% AlbuMAX, 2% human serum), and 100  $\mu$ M hypoxanthine under an atmosphere of 3%  $O_2$ , 5%  $CO_2$ , 91%  $N_2$ . After 48 h, the cells were fixed in 2% formaldehyde in PBS, transferred into PBS with 100 mM  $NH_4Cl$ , 0.1% Triton X-100, 1 nM YOYO-1, and then analyzed in a flow cytometer (FACSort, Beckton Dickinson; excitation 488 nm, emission 520 nm). Values of  $IC_{50}$  were calculated using GraphPad Prism software.

**Hemozoin-like Crystals Growth Inhibition.** Inhibition of hemozoin-like crystals formation by tested compounds was assessed using the previously described in vitro method.<sup>36</sup> In short, a hemozoin-like crystals stock suspension was sonicated for 3 min and diluted in fresh broth medium to a final concentration of 2  $\mu$ M (heme equivalents) in the wells of a 96-well plate. Stock solutions of tested compounds were prepared at 25 mM in DMSO. Stock solutions of chloroquine (positive control) and gentamicin (negative control) were prepared at 100 mM in distilled water, and all were 0.22- $\mu$ m-filtered previous to being diluted to 0–1000  $\mu$ M final concentration in the wells. Plates were incubated at 37 °C in a 5%  $CO_2$  atmosphere for 5 days to observe the presence or absence of crystal growth. All tests were performed in triplicate.

**Growth Inhibition against Transgenic *P. falciparum*.** 3D7-yDHOD-GFP, a transgenic derivative of *P. falciparum* 3D7 containing yeast dihydroorotate dehydrogenase (DHODH), was generated via the electroporation of purified pHHyDHOD-GFP plasmid into ring stages of *P. falciparum* using a Bio-Rad GenePulser as described previously.<sup>46</sup> *P. falciparum* cell extracts and measurement of cytochrome *c* reductase activity was performed as described previously.<sup>41,48</sup>

**In Vitro Liver Stage Activity Assays.** Huh-7 cells, a human hepatoma cell line, were cultured in 1640 RPMI medium supplemented with 10% v/v fetal calf serum (FCS), 1% v/v nonessential amino acids, 1% v/v penicillin/streptomycin, 1% v/v glutamine, and 10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), pH 7, and maintained at 37 °C with 5%  $CO_2$ . Inhibition of liver stage infection was determined by measuring the luminescence intensity in Huh-7 cells infected with a firefly luciferase-expressing *P. berghei* line, *PbGFP-Luc<sub>conv</sub>*, as previously described.<sup>47</sup> Briefly, cells ( $12 \times 10^3$ /well) were seeded in 96-well plates the day before drug treatment and infection. Tested compounds were prepared in the following way: 10 mM stock solutions were obtained by dissolving accurately weighed compounds in MeOH and dilutions subsequently made with medium to the desired concentration. Medium was replaced by fresh medium containing the appropriate concentration of each compound 1 h prior to infection. Sporozoites (10 000 spz/well), freshly obtained through disruption of salivary glands of infected female *Anopheles stephensi* mosquitos, were added to the wells 1 h after compound addition. Sporozoite addition was followed by centrifugation at 1700g for 5 min. At 24 h after infection, the medium was once more replaced by fresh medium containing the appropriate concentration of each compound. Inhibition of parasite development in the liver was measured 48 h after infection. The effect of the compounds on the viability of Huh-7 cells was assessed by the AlamarBlue assay (Invitrogen, U.K.), using the manufacturer's protocol. Nonlinear regression analysis was used to fit the normalized results of the dose–response curves, and  $IC_{50}$  values were determined using the SigmaPlot software.

**Rat Microsomes Stability Assay.** The viability of the rat microsomes was initially accessed by evaluating their CYP2E1-catalyzed *p*-nitrophenol hydroxylation capacity, applying a method-

ology described elsewhere.<sup>49</sup> Two parallel determinations in rat microsomes, with and without NADPH regenerating system, were performed for selected compounds. Compounds were incubated at 37 °C at 1  $\mu$ M in rat or mouse pooled liver microsomes (0.2 mg of protein/mL, BD Gentest, Discovery Labware Inc., Woburn, MA), suspended in 10 mM phosphate buffer solution (pH 7.4 at 25 °C). Metabolic reactions were initiated by the addition of a NADPH regenerating system A (31 mM  $NADP^+$ , 66 mM glucose 6-phosphate, and 0.67 mM  $MgCl_2$ ) and NADPH regenerating system B (BD Gentest, containing 40 U/mL glucose 6-phosphate dehydrogenase in 5 mM sodium citrate). At appropriate intervals, aliquots were removed and added to acetonitrile. The samples were mixed and centrifuged for 10 min at room temperature ( $\Sigma$ , 112g–4000g), and the supernatant fraction was analyzed by HPLC. Measurements were carried out in a LabChrom chromatograph coupled to a Merck Hitachi L-7100 pump, a Shimadzu SPD-SAV UV/vis spectrophotometric detector, and a Merck Hitachi 2500 integrator. A LichroCARTRP-18 (5  $\mu$ m, 250–254 mm) analytical column (Merck) was used with an acetonitrile/ $H_2O$  (25:75, v/v) eluent system. Elution was performed at a solvent flow rate of 1 mL/min. In the assay without NADPH generating system, 24  $\mu$ L of purified water was used instead of solutions A and B.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### § Supporting Information

General procedure for 6- and 7-substituted quinolin-4-amines, structural data of intermediates 7a–j, X-ray analysis of compound 5c, NMR spectra of compound 5o, HPLC conditions and retention times of final compounds 5a–v, and LC–MS analysis of microsomal incubation mixtures of compound 5u. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Phone: +351 217946400. E-mail: [aressurreicao@ff.ul.pt](mailto:aressurreicao@ff.ul.pt).

### Author Contributions

<sup>∞</sup>A.S.R. and D.G. contributed equally.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), Portugal, through Grants Pest-OE/SAL/UI4013/2011 and PTDC/SAU-FCF/098734/2008. A.R.S., A.S.R. and M.P. acknowledge FCT for a Ph.D. fellowship (Grant BD/51459/2011), postdoctoral fellowship (Grant BPD/64859/2009), and Programa Ciência 2007, respectively. M.M.M. is a Howard Hughes Medical Institute International Scholar, and P.J.R. is a Distinguished Clinical Scientist of the Doris Duke Charitable Foundation. Purified pHHyDHOD-GFP plasmid was generously provided by Akhil Vaidya (Drexel University College of Medicine, Philadelphia, PA). We also thank the staff and patients of Ward 7Y and the Gastroenterology Unit, Royal Liverpool Hospital, U.K., for their generous donation of blood.

## ■ ABBREVIATIONS USED

CQ, chloroquine; PQ, primaquine; DV, digestive vacuole; NMR, nuclear magnetic resonance; TEA, triethylamine; DEA, diethylamine; rt, room temperature; o/n, overnight; DMF, *N,N*-dimethylformamide; THF, tetrahydrofuran; DCM, dichloromethane; DMSO, dimethylsulfoxide; mtETC, mitochondrial electron transport chain; DHODH, dihydroorotate dehydrogenase; HPLC, high performance liquid chromatog-

raphy; LC–MS, liquid chromatography coupled to mass spectrometry

## REFERENCES

- (1) World Malaria Report 2012; World Health Organization: Geneva, 2012; [http://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2012/wmr2012\\_full\\_report.pdf](http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/wmr2012_full_report.pdf).
- (2) Murray, C. J. L.; Rosenfeld, L. C.; Lim, S. S.; Andrews, K. G.; Foreman, K. J.; Haring, D.; Fullman, N.; Naghavi, M.; Lozano, R.; Lopez, A. D. Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet* **2012**, *379*, 413–431.
- (3) Rodrigues, T.; Moreira, R.; Lopes, F. NEW hope in the fight against malaria? *Future Med. Chem.* **2011**, *3*, 1–3.
- (4) Burrows, J. N.; Leroy, D.; Lotharius, J.; Waterson, D. Challenges in antimalarial drug discovery. *Future Med. Chem.* **2011**, *3*, 1401–1412.
- (5) Gamo, F. J.; Sanz, L. M.; Vidal, J.; de Cozar, C.; Alvarez, E.; Lavandera, J. L.; Vanderwall, D. E.; Green, D. V. S.; Kumar, V.; Hasan, S.; Brown, J. R.; Peishoff, C. E.; Cardon, L. R.; Garcia-Bustos, J. F. Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. *Nature* **2010**, *465*, 305–310.
- (6) Guiguemde, W. A.; Shelat, A. A.; Bouck, D.; Duffy, S.; Crowther, G. J.; Davis, P. H.; Smithson, D. C.; Connelly, M.; Clark, J.; Zhu, F. Y.; Jimenez-Diaz, M. B.; Martinez, M. S.; Wilson, E. B.; Tripathi, A. K.; Gut, J.; Sharlow, E. R.; Bathurst, I.; El Mazouni, F.; Fowble, J. W.; Forquer, I.; McGinley, P. L.; Castro, S.; Angulo-Barturen, I.; Ferrer, S.; Rosenthal, P. J.; DeRisi, J. L.; Sullivan, D. J.; Lazo, J. S.; Roos, D. S.; Riscoe, M. K.; Phillips, M. A.; Rathod, P. K.; Van Voorhis, W. C.; Avery, V. M.; Guy, R. K. Chemical genetics of *Plasmodium falciparum*. *Nature* **2010**, *465*, 311–315.
- (7) Alonso, P. L.; Brown, G.; Arevalo-Herrera, M.; Binka, F.; Chitnis, C.; Collins, F.; Doumbo, O. K.; Greenwood, B.; Hall, B. F.; Levine, M. M.; Mendis, K.; Newman, R. D.; Plowe, C. V.; Rodriguez, M. H.; Sinden, R.; Slutsker, L.; Tanner, M. A research agenda to underpin malaria eradication. *PLoS Med.* **2011**, *8*, e1000406.
- (8) Alonso, P. L.; Djimde, A.; Kremsner, P.; Magill, A.; Milman, J.; Najera, J.; Plowe, C. V.; Rabinovich, R.; Wells, T.; Yeung, S. A research agenda for malaria eradication: drugs. *PLoS Med.* **2011**, *8*, e1000402.
- (9) Prudencio, M.; Mota, M. M.; Mendes, A. M. A toolbox to study liver stage malaria. *Trends Parasitol.* **2011**, *27*, 565–574.
- (10) Wells, T. N. C.; Burrows, J. N.; Baird, J. K. Targeting the hypnozoite reservoir of *Plasmodium vivax*: the hidden obstacle to malaria elimination. *Trends Parasitol.* **2010**, *26*, 145–151.
- (11) Mazier, D.; Renia, L.; Snounou, G. A pre-emptive strike against malaria's stealthy hepatic forms. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2009**, *8*, 854–864.
- (12) Derbyshire, E. R.; Mota, M. M.; Clardy, J. The next opportunity in anti-malaria drug discovery: the liver stage. *PLoS Pathog.* **2011**, *7*, e1002178.
- (13) Vale, N.; Moreira, R.; Gomes, P. Primaquine revisited six decades after its discovery. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 937–953.
- (14) Rodrigues, T.; Prudêncio, M.; Moreira, R.; Mota, M. M.; Lopes, F. Targeting the liver stage of malaria parasites: a yet unmet goal. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 995–1012.
- (15) Meister, S.; Plouffe, D. M.; Kuhen, K. L.; Bonamy, G. M. C.; Wu, T.; Barnes, S. W.; Bopp, S. E.; Borboa, R.; Bright, A. T.; Che, J. W.; Cohen, S.; Dharia, N. V.; Gagaring, K.; Gettayacamin, M.; Gordon, P.; Groessl, T.; Kato, N.; Lee, M. C. S.; McNamara, C. W.; Fidock, D. A.; Nagle, A.; Nam, T. G.; Richmond, W.; Roland, J.; Rottmann, M.; Zhou, B.; Froissard, P.; Glynn, R. J.; Mazier, D.; Sattabongkot, J.; Schultz, P. G.; Tuntland, T.; Walker, J. R.; Zhou, Y. Y.; Chatterjee, A.; Diagona, T. T.; Winzeler, E. A. Imaging of *Plasmodium* liver stages to drive next-generation antimalarial drug discovery. *Science* **2011**, *334*, 1372–1377.
- (16) da Cruz, F. P.; Martin, C.; Buchholz, K.; Lafuente-Monasterio, M. J.; Rodrigues, T.; Sonnichsen, B.; Moreira, R.; Gamo, F. J.; Marti, M.; Mota, M. M.; Hannus, M.; Prudêncio, M. Drug screen targeted at *Plasmodium* liver stages identifies a potent multistage antimalarial drug. *J. Infect. Dis.* **2012**, *205*, 1278–1286.
- (17) Derbyshire, E. R.; Prudêncio, M.; Mota, M. M.; Clardy, J. Liver-stage malaria parasites vulnerable to diverse chemical scaffolds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109*, 8511–8516.
- (18) Lopes, F.; Capela, R.; Goncaves, J. O.; Horton, P. N.; Hursthouse, M. B.; Iley, J.; Casimiro, C. M.; Bom, J.; Moreira, R. Amidomethylation of amodiaquine: antimalarial N-Mannich base derivatives. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 7663–7666.
- (19) Lopes, F.; Moreira, R.; Iley, J. Acyloxymethyl as a drug protecting group. Part 6: N-Acyloxymethyl- and N-(aminocarbonyloxy)methyl sulfonamides as prodrugs of agents containing a secondary sulfonamide group. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 707–716.
- (20) Iley, J.; Barroso, H.; Moreira, R.; Lopes, F.; Calheiros, T. Acyloxymethyl as a drug protecting group. Part 7: Tertiary sulfonamidomethyl ester prodrugs of benzylpenicillin: chemical hydrolysis and anti-bacterial activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1629–1636.
- (21) Rodrigues, T.; Moreira, R.; Guedes, R. C.; Iley, J.; Lopes, F. Unanticipated acyloxymethylation of sumatriptan indole nitrogen atom and its implications in prodrug design. *Arch. Pharm.* **2008**, *341*, 344–350.
- (22) Iley, J.; Lopes, F.; Moreira, R. Kinetics and mechanism of hydrolysis of N-amidomethylsulfonamides. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2001**, 749–753.
- (23) Lim, H. K.; Chen, J.; Sensenhauser, C.; Cook, K.; Preston, R.; Thomas, T.; Shook, B.; Jackson, P. F.; Rassnick, S.; Rhodes, K.; Gopaul, V.; Salter, R.; Silva, J.; Evans, D. C. Overcoming the genotoxicity of a pyrrolidine substituted arylindenopyrimidine as a potent dual adenosine A(2A)/A(1) antagonist by minimizing bioactivation to an iminium ion reactive intermediate. *Chem. Res. Toxicol.* **2011**, *24*, 1012–1030.
- (24) Rodrigues, T.; da Cruz, F. P.; Lafuente-Monasterio, M. J.; Goncalves, D.; Ressurreição, A. S.; Siteo, A. R.; Bronze, M. R.; Gut, J.; Schneider, G.; Mota, M. M.; Rosenthal, P. J.; Prudêncio, M.; Gamo, F. J.; Lopes, F.; Moreira, R. Quinolin-4(1H)-imines are potent antiparasitic drugs targeting the liver stage of malaria. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 4811–4815.
- (25) Rodrigues, T.; Moreira, R.; Dacunha-Marinheiro, B.; Lopes, F. Bis[(E)-3-(diethylmethylammonio)methyl-N-3-(N,N-dimethylsulfamoyl)-1-methylpyridin-4-ylidene-4-methoxyanilinium]tetraiodide pentahydrate. *Acta Crystallogr., Sect. E: Struct. Rep. Online* **2009**, *65*, o283–o284.
- (26) De, D. Y.; Byers, L. D.; Krogstad, D. J. Antimalarials: synthesis of 4-aminoquinolines that circumvent drug resistance in malaria parasites. *J. Heterocycl. Chem.* **1997**, *34*, 315–320.
- (27) Madrid, P. B.; Sherrill, J.; Liou, A. P.; Weisman, J. L.; DeRisi, J. L.; Guy, R. K. Synthesis of ring-substituted 4-aminoquinolines and evaluation of their antimalarial activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 1015–1018.
- (28) Hansch, C.; Leo, A.; Taft, R. W. A survey of Hammett substituent constants and resonance and field parameters. *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 165–195.
- (29) Perrin, D. D.; Dempsey, B.; Serjeant, E. P. *pKa Prediction for Organic Acids and Bases*; Chapman and Hall: London, 1981; p 146.
- (30) Warhurst, D. C.; Craig, J. C.; Adagu, P. S.; Guy, R. K.; Madrid, P. B.; Fivelman, Q. L. Activity of piperazine and other 4-aminoquinoline antiparasitic drugs against chloroquine-sensitive and resistant blood-stages of *Plasmodium falciparum*: role of beta-haematin inhibition and drug concentration in vacuolar water- and lipid-phases. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *73*, 1910–1926.
- (31) Egan, T. J.; Combrinck, J. M.; Egan, J.; Hearne, G. R.; Marques, H. M.; Ntenti, S.; Sewell, B. T.; Smith, P. J.; Taylor, D.; van Schalkwyk, D. A.; Walden, J. C. Fate of haem iron in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem. J.* **2002**, *365*, 343–347.
- (32) Tilley, L.; Dixon, M. W. A.; Kirk, K. The *Plasmodium falciparum*-infected red blood cell. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2011**, *43*, 839–842.
- (33) Weissbuch, I.; Leiserowitz, L. Interplay between malaria, crystalline hemozoin formation, and antimalarial drug action and design. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 4899–4914.

- (34) Combrinck, J. M.; Mabotha, T. E.; Ncokazi, K. K.; Ambele, M. A.; Taylor, D.; Smith, P. J.; Hoppe, H. C.; Egan, T. J. Insights into the role of heme in the mechanism of action of antimalarials. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 133–137.
- (35) Hilal, S. H.; Karickhoff, S. W.; Carreira, L. A. A rigorous test for SPARC's chemical reactivity models: estimation of more than 4300 ionization pK(a)s. *Quant. Struct.–Act. Relat.* **1995**, *14*, 348–355.
- (36) Thomas, V.; Gois, A.; Ritts, B.; Burke, P.; Hanscheid, T.; McDonnell, G. A novel way to grow hemozoin-like crystals in vitro and its use to screen for hemozoin inhibiting antimalarial compounds. *PLoS One* **2012**, *7*, e41006.
- (37) Kesten, S. J.; Degnan, M. J.; Hung, J. L.; McNamara, D. J.; Ortwine, D. F.; Uhlendorf, S. E.; Werbel, L. M. Antimalarial drugs. 64. Synthesis and antimalarial properties of 1-imino derivatives of 7-chloro-3-substituted-3,4-dihydro-1,9(2*H*,10*H*)-acridinediones and related structures. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 3429–3447.
- (38) Berman, J.; Brown, L.; Miller, R.; Andersen, S. L.; McGreevy, P.; Schuster, B. G.; Ellis, W.; Ager, A.; Rossan, R. Antimalarial activity of WR 243251, a dihydroacridinedione. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, *38*, 1753–1756.
- (39) Suswam, E.; Kyle, D.; Lang-Unnasch, N. *Plasmodium falciparum*: the effects of atovaquone resistance on respiration. *Exp. Parasitol.* **2001**, *98*, 180–187.
- (40) Rodrigues, T.; Lopes, F.; Moreira, R. Inhibitors of the mitochondrial electron transport chain and de novo pyrimidine biosynthesis as antimalarials: the present status. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 929–956.
- (41) Biagini, G. A.; Fisher, N.; Berry, N.; Stocks, P. A.; Meunier, B.; Williams, D. P.; Bonar-Law, R.; Bray, P. G.; Owen, A.; O'Neill, P. M.; Ward, S. A. Acridinediones: selective and potent inhibitors of the malaria parasite mitochondrial bc(1) complex. *Mol. Pharmacol.* **2008**, *73*, 1347–1355.
- (42) Cowley, R.; Leung, S.; Fisher, N.; Al-Helal, M.; Berry, N. G.; Lawrenson, A. S.; Sharma, R.; Shone, A. E.; Ward, S. A.; Biagini, G. A.; O'Neill, P. M. The development of quinolone esters as novel antimalarial agents targeting the *Plasmodium falciparum* bc(1) protein complex. *MedChemComm.* **2012**, *3*, 39–44.
- (43) Zhang, Y. Q.; Clark, J. A.; Connelly, M. C.; Zhu, F. Y.; Min, J. K.; Guiguemde, W. A.; Pradhan, A.; Iyer, L.; Furimsky, A.; Gow, J.; Parman, T.; El Mazouni, F.; Phillips, M. A.; Kyle, D. E.; Mirsalis, J.; Guy, R. K. Lead optimization of 3-carboxyl-4(1*H*)-quinolones to deliver orally bioavailable antimalarials. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4205–4219.
- (44) Yeates, C. L.; Batchelor, J. F.; Capon, E. C.; Cheesman, N. J.; Fry, M.; Hudson, A. T.; Pudney, M.; Trimming, H.; Woolven, J.; Bueno, J. M.; Chicharro, J.; Fernandez, E.; Fiandor, J. M.; Gargallo-Viola, D.; de las Heras, F. G.; Herreros, E.; Leon, M. L. Synthesis and structure–activity relationships of 4-pyridones as potential antimalarials. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2845–2852.
- (45) Biagini, G. A.; Fisher, N.; Shone, A. E.; Mubarak, M. A.; Srivastava, A.; Hill, A.; Antoine, T.; Warman, A. J.; Davies, J.; Pidathala, C.; Amewu, R. K.; Leung, S. C.; Sharma, R.; Gibbons, P.; Hong, D. W.; Pacorel, B.; Lawrenson, A. S.; Charoensutthivarakul, S.; Taylor, L.; Berger, O.; Mbekeani, A.; Stocks, P. A.; Nixon, G. L.; Chadwick, J.; Hemingway, J.; Delves, M. J.; Sinden, R. E.; Zeeman, A. M.; Kocken, C. H. M.; Berry, N. G.; O'Neill, P. M.; Ward, S. A. Generation of quinolone antimalarials targeting the *Plasmodium falciparum* mitochondrial respiratory chain for the treatment and prophylaxis of malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109*, 8298–8303.
- (46) Painter, H. J.; Morrissey, J. M.; Mather, M. W.; Vaidya, A. B. Specific role of mitochondrial electron transport in blood-stage *Plasmodium falciparum*. *Nature* **2007**, *446*, 88–91.
- (47) Ploemen, I. H. J.; Prudêncio, M.; Douradinha, B. G.; Ramesar, J.; Fonager, J.; van Gemert, G.-J.; Luty, A. J. F.; Hermsen, C. C.; Sauerwein, R. W.; Baptista, F. G.; Mota, M. M.; Waters, A. P.; Que, L.; Lowik, C. W. G. M.; Khan, S. M.; Janse, C. J.; Franke-Fayard, B. M. D. Visualisation and quantitative analysis of the rodent malaria liver stage by real time imaging. *PLoS One* **2009**, *4*, e7881.
- (48) Vallieres, C.; Fisher, N.; Antoine, T.; Al-Helal, M.; Stocks, P.; Berry, N. G.; Lawrenson, A. S.; Ward, S. A.; O'Neill, P. M.; Biagini, G. A.; Meunier, B. HDQ, a potent inhibitor of *Plasmodium falciparum* proliferation, binds to the quinone reduction site of the cytochrome bc(1) complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 3739–3747.
- (49) Chang, T. K. H.; Crespi, C. L.; Waxman, D. J. Spectrophotometric analysis of human CYP2E1-catalyzed *p*-nitrophenol hydroxylation. *Methods Mol. Biol.* **2006**, *320*, 127–131.



# *Antiplasmodial Drugs in the Gas Phase: A CID and DFT Study of Quinolon-4(1H)-Imine Derivatives*

Paulo J. Amorim Madeira, Ana Raquel Fernandes Siteo, Daniel Gonçalves, Tiago Rodrigues, Rita C. Guedes, Francisca Lopes, et al.

## **Journal of The American Society for Mass Spectrometry**

The official journal of The American Society for Mass Spectrometry

ISSN 1044-0305

Volume 25

Number 9

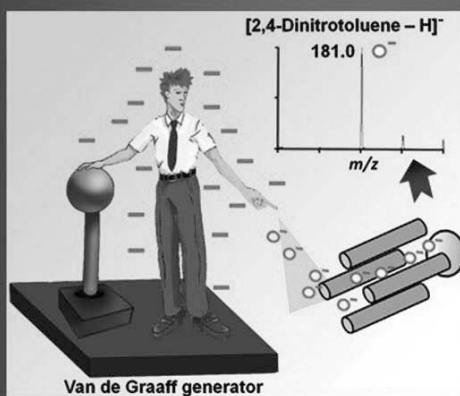
J. Am. Soc. Mass Spectrom. (2014)  
25:1650-1661

DOI 10.1007/s13361-014-0940-x

Volume 25 Number 9

September 2014

## Journal of The American Society for **MASS SPECTROMETRY**



In this Issue:

Communication on:  
Zundel-type H Bonding

Articles on:

- Ionization Methods
- Ion Mobility
- Crosslinking
- Ion Chemistry
- Distonic Ions

Megavolt electrostatic ionization MS for direct analysis of substances from large living organisms, see page 1515.

ISSN 1044-0305 • 25 (9) 1511-1674 (2014) • 13361



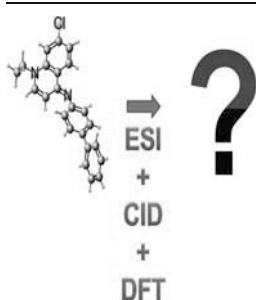
**Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by American Society for Mass Spectrometry. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at [link.springer.com](http://link.springer.com)".**

## RESEARCH ARTICLE

# Antiplasmodial Drugs in the Gas Phase: A CID and DFT Study of Quinolone-4(*1H*)-Imine Derivatives

Paulo J. Amorim Madeira, Ana Raquel Fernandes Siteo, Daniel Gonçalves, Tiago Rodrigues, Rita C. Guedes, Francisca Lopes, Rui Moreira, M. Rosário Bronze

Research Institute for Medicines (iMed.U LISBOA), Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, 1649-003, Lisbon, Portugal



**Abstract.** The gas-phase behavior of 12 quinolone-4(*1H*)-imine derivatives with antiplasmodial activity was investigated using electrospray ionization tandem mass spectrometry together with collision induced dissociation and density functional theory (DFT) calculations. The most probable protonation site was predicted by calculating the proton affinity (PA) values for each possible protonation site and it was found to be the imine nitrogen for all compounds under study. Fragmentation pathways of the protonated molecules were proposed and the assignment of product ion structures was performed taking into account theoretical calculations. The nature of the quinoline substituent was found to influence the gas-phase behavior of the compounds under study. The data

acquired allowed to bracket the proton affinity of the quinolone-4-imine scaffold, which can be a useful starting point to choose appropriate references for determining PA values of this scaffold.

**Keywords:** Electrospray ionization, Triple quadrupole, Collision induced dissociation, Antimalarial drugs, Liver stage, DFT

Received: 31 March 2014/Revised: 26 May 2014/Accepted: 26 May 2014/Published online: 8 July 2014

## Introduction

Malaria remains a major global public health problem, being responsible for over 200 million infections worldwide, mainly in tropical and subtropical regions, and with an estimated death toll of nearly 627,000 individuals in 2012 [1]. From the five species of the genus *Plasmodium* that can cause infections in humans, *P. falciparum* and *P. vivax* account for more than 95% of malaria cases, with *P. falciparum* being responsible for most of the deaths by malaria every year [2, 3].

The emergence and spread of parasite resistance to most of the available antimalarial drugs renders these agents ineffective in the treatment and prevention of malaria. To circumvent this problem, new chemical entities acting against erythrocytic stage parasites (i.e., blood stage) have been discovered over the years. These erythrocytic stage parasites are responsible for the clinical symptoms of the disease.

However, eradication of malaria can only be successful if multiple parasite life-cycle stages are targeted [4, 5]. Malaria parasites undergo an asymptomatic (and mandatory) developmental phase in the liver, which precedes the blood stage. Furthermore, some parasite strains form hypnozoites that are not eliminated by standard therapy, persisting in the liver for a long period, are responsible for malaria relapses [6]. Hence, the liver stage of infection provides an important target for intervention, in addition to the blood stage. Primaquine is the only clinically approved drug that eliminates liver hypnozoites of *Plasmodium* while exhibiting moderate blood stage potency. However, it leads to several side effects, including hemolysis, in patients with glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency commonly found in malaria-endemic regions, which limits its clinical use. Thus, there is an urgent need to discover safer and more effective liver stage antimalarial drugs [7].

Mass spectrometry has long been used in antimalarial drug studies, usually combined with a separation technique (e.g., high pressure liquid chromatography) [8]. Nevertheless, most of the work available in the literature focus solely on identification of drugs in biological matrices [9], drug metabolite profiling [10], or even counterfeit detection [11–13] (the work referenced here is only but a small part of the numerous references that can be found in the literature; the

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s13361-014-0940-x) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Correspondence to: Paulo J. Amorim Madeira; e-mail: pjmadeira@ff.ul.pt

reader is encouraged to seek more information in the literature). There are, however, a few exceptions, in which the authors specifically targeted the fragmentation of primaquine derived imidazolin-4-ones in search of possible correlations between the gas-phase behavior and other known properties for these compounds [14–16].

Recently, we reported quinolon-4(*1H*)-imines to be potent antiplasmodial drugs targeting both the liver and the blood stage of malaria parasite [17], as well as the structural optimization of this scaffold in order to increase potency and metabolic stability [2]. Making use of electrospray ionization and tandem mass spectrometry together with collision induced dissociation experiments (CID) and density functional theory (DFT) calculations, we present a complete study of the gas-phase behavior, in positive ion mode, of 12 novel antiplasmodial agents (Scheme 1). The knowledge of the gas-phase behavior, specifically the fragmentation pathways, of these compounds will certainly be useful when applying LC-MS methodologies to perform detailed metabolism studies, both in vitro and in vivo.

## Experimental

### Reagents

The structures of the compounds under study are presented in Scheme 1. These were prepared by methodologies already

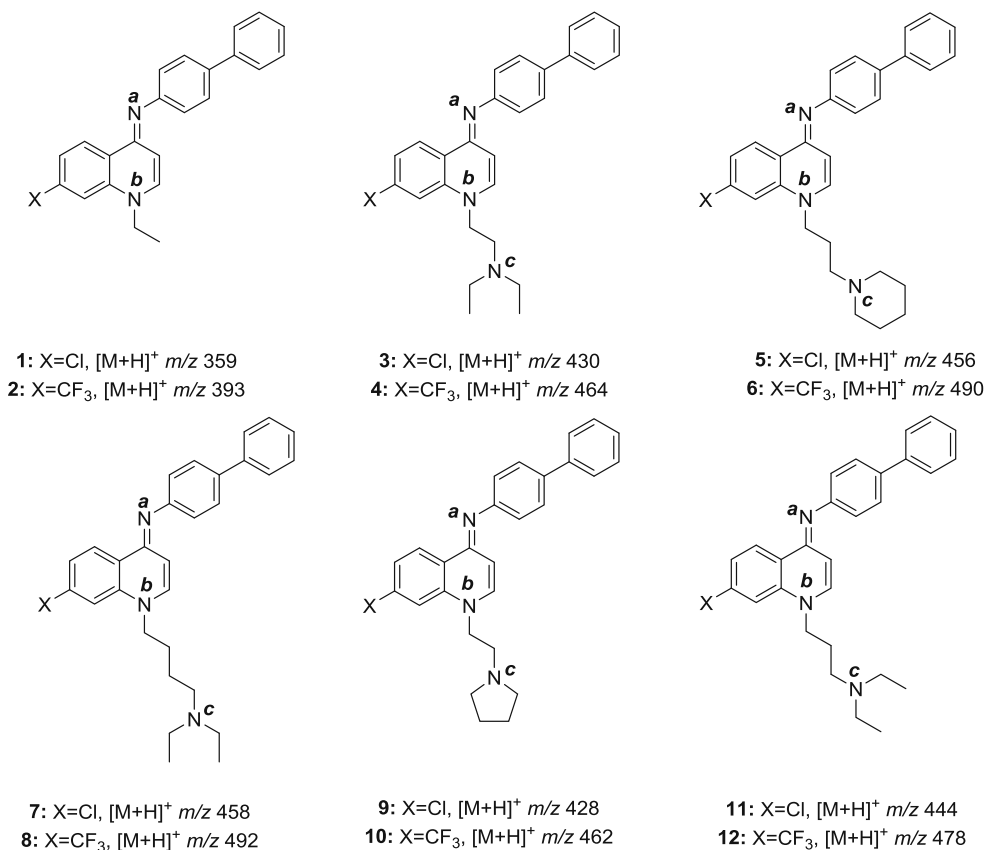
described in the literature [2, 17] and used without further purification. Analyte solutions were prepared in LC-MS grade acetonitrile (Fluka, Seelze, Germany) at a concentration of 10  $\mu\text{M}$  and acidified with 1% LC-MS grade formic acid (Fluka).

### Mass Spectrometry

The experiments were performed on a Quattro Micro API triple-quadrupole mass spectrometer from Waters (Manchester, UK) in the positive ion mode. Analyte solutions, concentration ca. 10  $\mu\text{M}$ , were infused by means of an infusion pump at a flow rate of 10  $\mu\text{L min}^{-1}$  into the electrospray source. All the instrumental parameters were optimized in order to improve the signal-to-noise ratio. Briefly, the capillary was set to 2.5 kV, the sampling cone to 10 V, and the extractor to 1 V. The desolvation and cone gas flows were set to 200 and 50  $\text{Lh}^{-1}$ , respectively. The source was maintained at 120°C throughout the experiments and the desolvation temperature was set to 350°C. The  $\text{MS}^2$  experiments were performed using Argon (Gasin, Leça da Palmeira, Portugal) as collision gas at a pressure of ca.  $3 \times 10^{-3}$  mbar.

Methanol- $d_1$  ( $\text{CH}_3\text{OD}$ ) (Sigma-Aldrich, Seelze, Germany) was used in the sample preparation to obtain the  $[\text{M}+\text{D}]^+$  ion of Compounds **1** and **2**.

The energy-dependent collision induced dissociation (CID) experiments were performed by increasing the laboratory frame collision energy ( $E_{\text{lab}}$ ) from 0 to ca. 45 eV. This laboratory frame collision energy was converted



Scheme 1. Structure of the compounds under study

to the center-of-mass collision energy ( $E_{CM}$ ) using the expression  $E_{CM} = E_{lab} \times [m_{neutral}/(m_{ion} + m_{neutral})]$ , where  $m_{ion}$  is the mass of the isolated precursor ion and  $m_{neutral}$  is the mass of the collision gas (argon in our case).

### Theoretical Calculations

Density functional theory (DFT) calculations were performed using the Gaussian 03 suite of programs [18] with the B3LYP hybrid functional, which includes a mixture of Hartree-Fock exchange with DFT exchange correlation given by Becke's three-parameter hybrid functional with Lee, Yang, and Parr's gradient corrected correlation functional [19, 20]. Furthermore, Pople's 6-311+G(d,p) basis set was used in all atoms.

Marvin and Calculator plugins [21] were used to draw and to perform an initial structure optimization, under the framework of an MMFF94 force field, of the neutral compounds and the corresponding protonated molecules. These structures were then further optimized without any geometry constraints at the B3LYP/6-311+G(d,p) level of theory, as mentioned above. Harmonic second derivatives were calculated to evaluate the nature of minima and to estimate values for zero point energy (ZPE) and thermal correction to enthalpy. The enthalpies at 298 K were obtained from  $H = E_e + ZPE + H_{trans} + H_{rot} + H_{vib} + RT$ , where  $E_e$  is the electronic energy,  $ZPE$  is the zero-point energy, and  $H_{trans}$ ,  $H_{rot}$  and  $H_{vib}$  are the translational, rotational and vibrational contributions, respectively.  $H_{trans}$  and  $H_{rot}$  are  $(3/2)RT$  for a non-linear molecule;  $H_{vib}$  (thermal correction to enthalpy) is extracted directly from the Gaussian03 frequency calculation output. The last term,  $RT$ , stands for the pV work.

For the product ions the strategy followed was the same as for the neutral and protonated molecules, i.e., their structures were first drawn and optimized using Marvin and Calculator plugins [21], which were further optimized at the B3LYP/6-311+G(d,p) level of theory including frequency calculations to access the true nature of the minima, using Gaussian 03 [18]. Avogadro 1.0.1 was used to visualize the outputs [22].

## Results and Discussion

We begin this section by addressing the probable protonation site for each molecule under study using DFT calculations. The gas-phase behavior (comprising collision induced dissociation experiments and complemented with DFT calculations) will be addressed later on this section.

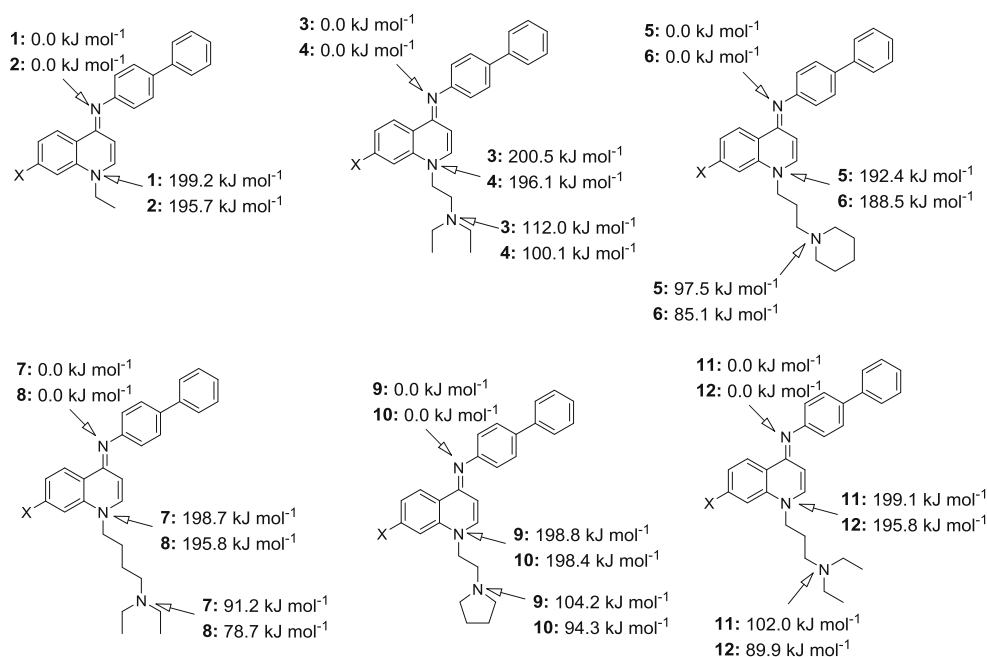
### Protonation Sites of the Quinolone-4(1H)-Imine Derivatives

All the analytes considered in the present study show two or three possible protonation sites: the imine nitrogen (site *a*), the quinoline nitrogen (site *b*), and the alkylamine nitrogen

(site *c*). The knowledge of the most probable protonation site is valuable when proposing fragmentation mechanisms [23, 24] and, for this reason, the most probable protonation site was predicted by calculating the proton affinity of each possible protonation site. However, one must take into account that these calculations were performed without considering external excitation of the ion (i.e., activation). There is the possibility that the proton might move along the ion during the time that precedes ion fragmentation after the activation step. The results presented in Table 1 and Figure 1 clearly show that protonation at the imine nitrogen is energetically more favored than the other possibilities (i.e., protonation at the quinoline nitrogen and at the alkylamine nitrogen). Such behavior was already described for semiquinodimines and related compounds [25], and the high basicity of the semiquinoid structure was ascribed to a significant aromatization of this structure. Protonation at the alkylamine nitrogen affords a higher energy structure (in average ca. 100 kJ mol<sup>-1</sup>), which was expected since no extra stabilization is possible. Protonation of the quinoline nitrogen affords a structure with an energy ca. 200 kJ mol<sup>-1</sup> higher than the most stable structure.

**Table 1.** Proton Affinity (PA) Values for the Compounds Under Study Computed at the B3LYP [19] Level of Theory and Using the 6-311+G(d,p) Basis set. (For Numbering of the Possible Protonation Sites See Scheme 1, the Highest PA Values are Italicized)

Compound	Protonation site	PA (kJ mol <sup>-1</sup> )
1	<i>a</i>	<i>1005.9</i>
	<i>b</i>	808.6
2	<i>a</i>	<i>992.8</i>
	<i>b</i>	799.3
3	<i>a</i>	<i>1010.7</i>
	<i>b</i>	811.9
	<i>c</i>	896.1
4	<i>a</i>	<i>997.1</i>
	<i>b</i>	803.0
	<i>c</i>	894.1
5	<i>a</i>	<i>1008.1</i>
	<i>b</i>	816.0
	<i>c</i>	906.2
6	<i>a</i>	<i>994.4</i>
	<i>b</i>	807.1
	<i>c</i>	906.5
7	<i>a</i>	<i>1010.4</i>
	<i>b</i>	813.2
	<i>c</i>	915.4
8	<i>a</i>	<i>998.3</i>
	<i>b</i>	803.9
	<i>c</i>	915.7
9	<i>a</i>	<i>996.4</i>
	<i>b</i>	799.6
	<i>c</i>	889.5
10	<i>a</i>	<i>998.8</i>
	<i>b</i>	801.2
	<i>c</i>	901.5
11	<i>a</i>	<i>1010.4</i>
	<i>b</i>	812.6
	<i>c</i>	903.1
12	<i>a</i>	<i>998.6</i>
	<i>b</i>	804.9
	<i>c</i>	904.4

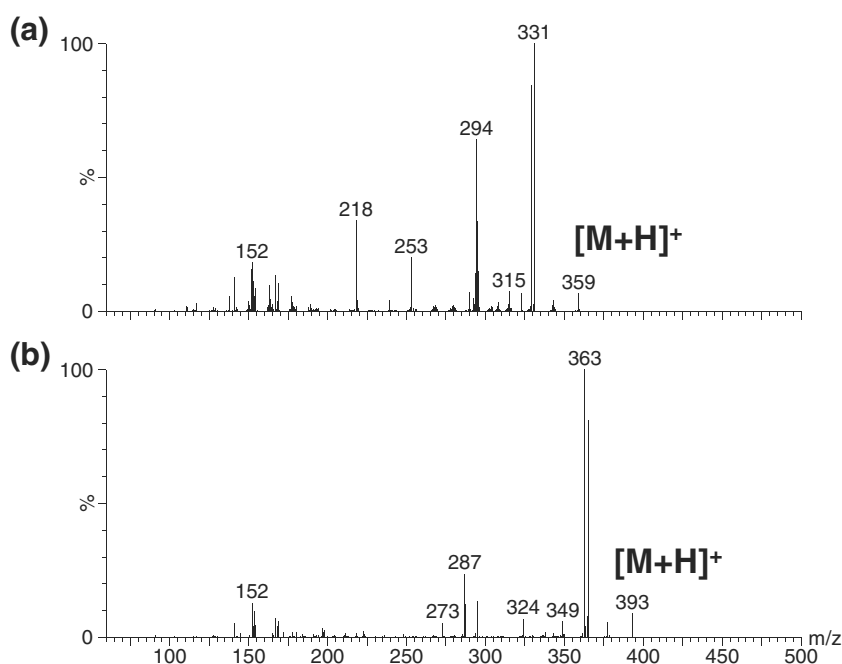


**Figure 1.** Possible structures and relative energies (in  $\text{kJ mol}^{-1}$ ) for the protonated molecules of the compounds under study

### Fragmentation Pathways of the Quinolone-4(1H)-Imine Derivatives

The  $\text{MS}^2$  spectra, taken at  $E_{\text{lab}} = 45 \text{ eV}$ , of the protonated molecules of Compounds **1** and **2** are presented in Figure 2, and the  $\text{MS}^2$  data for the protonated molecules of the remaining Compounds (**3–12**) are shown in Table 2 (the spectra are presented as Supplementary Information,

Figures S1–S10). Comparing these two sets of data, it is quite clear that these two families of compounds behave differently under CID conditions. The protonated molecules of **1** and **2** show a rather complex fragmentation pattern, whereas the protonated **3–12** show only up to three or four fragment ions. The differences between these two sets of compounds are the substituent at the quinoline ring nitrogen



**Figure 2.**  $\text{MS}^2$  spectra at  $E_{\text{lab}} = 45 \text{ eV}$  of **(a)** Compound **1**; **(b)** Compound **2**

**Table 2.** MS<sup>2</sup> Data at E<sub>lab</sub> = 15 eV for Compounds 3–12

Compound	Precursor ion <i>m/z</i> (Rel. Ab., %)	Product ions <i>m/z</i> (Rel. Ab., %)
3	430 (50%)	100 (100%), 72 (<1%) <sup>a</sup>
4	464 (52%)	100 (100%), 72 (<1%) <sup>a</sup>
5	456 (100%)	126 (28%), 98 (<1%) <sup>a</sup>
6	490 (89%)	126 (100%), 98 (1%) <sup>a</sup>
7	458 (14%)	128 (100%) <sup>b</sup>
8	492 (11%)	128 (100%) <sup>b</sup>
9	428 (100%)	98 (65%) <sup>b</sup>
10	462 (81%)	98 (100%) <sup>b</sup>
11	444 (100%)	114 (56%), 86 (1%) <sup>a</sup>
12	478 (100%)	114 (22%), 86 (1%) <sup>a</sup>

<sup>a</sup>The relative abundance of the ion increased when the E<sub>lab</sub> was increased to 30 eV to values ranging from 5% to 20%.

<sup>b</sup>When the E<sub>lab</sub> was increased above 25 eV losses of 42 Da (Compounds 7–10) and 44 Da (Compounds 7 and 8) were detected although with relative abundances lower than 3%.

**Table 3.** Product Ion Attributions for the Protonated Molecules of Compounds 1 and 2

nd = not detected.

Attribution	<i>m/z</i>	
	Compound 1	Compound 2
[M+H] <sup>+</sup>	359	393
[M+H-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	331	365
[M+H-C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> ] <sup>+</sup>	329	363
[M+H-CF <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	nd	324
[M+H-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> NH] <sup>++</sup>	315	349
[M+H-CF <sub>3</sub> -C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ] <sup>++</sup>	nd	295
[M+H-C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> -Cl] <sup>++</sup>	294	nd
[M+H-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> ] <sup>+</sup>	253	287
[M+H-CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> NH-C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> ] <sup>++</sup>	239	273
[M+H-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> -Cl] <sup>++</sup>	218	nd
C <sub>12</sub> H <sub>9</sub> N <sup>++</sup>	167	
C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> <sup>++</sup>	152	
C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> N <sup>++</sup>	141	

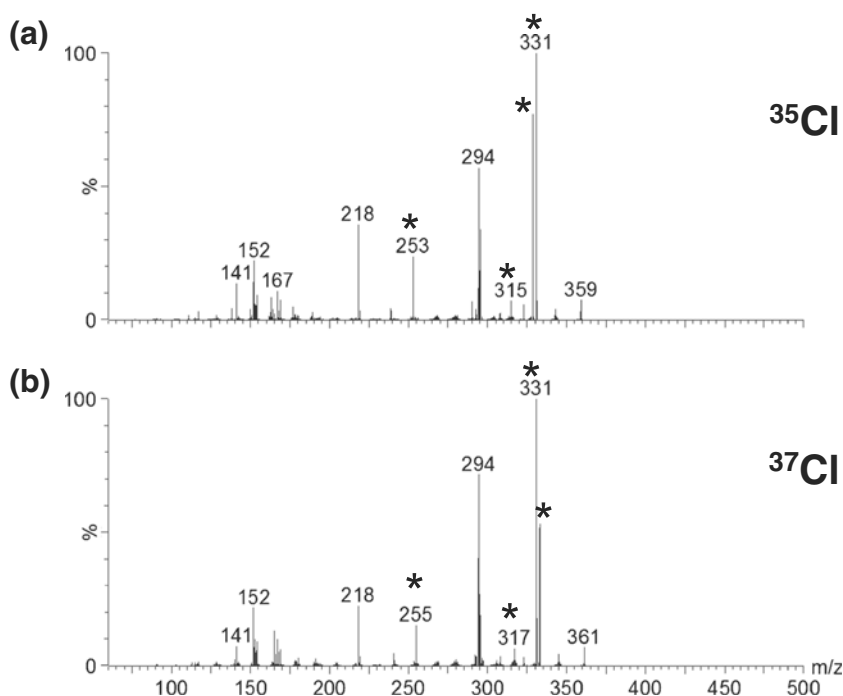
nd = not detected.

(ethyl for Compounds 1 and 2, and alkylamines for the remaining compounds) and the substituent at position 7 (either a Cl or a CF<sub>3</sub>).

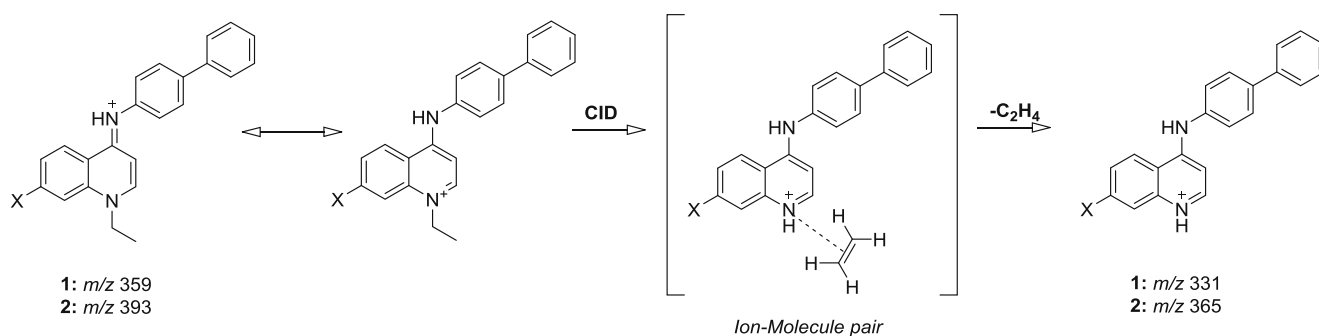
Since Compound 1 possesses one chlorine atom, it is possible to assess which transitions involve the loss of chlorine by isolating and fragmenting the <sup>37</sup>Cl isotopic peak of the protonated molecules (i.e., *m/z* 361) in the triple quadrupole's collision cell. The end result is a MS<sup>2</sup> spectrum; see Figure 3, where the ions that suffer an *m/z* shift of two units continue to bear the Cl atom in

their structure. This simple procedure allowed us to conclude that the product ions at *m/z* 343, 331, 329, 315, 253, and 239 have the Cl atom in their structures. The attributions for the various product ions present in the MS<sup>2</sup> spectra of protonated 1 and 2 are presented in Table 3.

The protonated molecules of Compounds 1 and 2 can lose ethene (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>, 28 Da), affording the ions at *m/z* 331 (1)



**Figure 3.** MS<sup>2</sup> data, at E<sub>lab</sub> = 45 eV of protonated Compound 1. (a) MS<sup>2</sup> spectrum of the <sup>35</sup>Cl isotopic peak; (b) MS<sup>2</sup> spectrum of the <sup>37</sup>Cl isotopic peak. (\*) Indicates the ions that suffered a mass shift)



**Scheme 2.** Proposed mechanism for the loss of  $C_2H_4$  from protonated Compounds **1** ( $X = Cl$ ) and **2** ( $X = CF_3$ ) through the formation of an ion-molecule pair complex

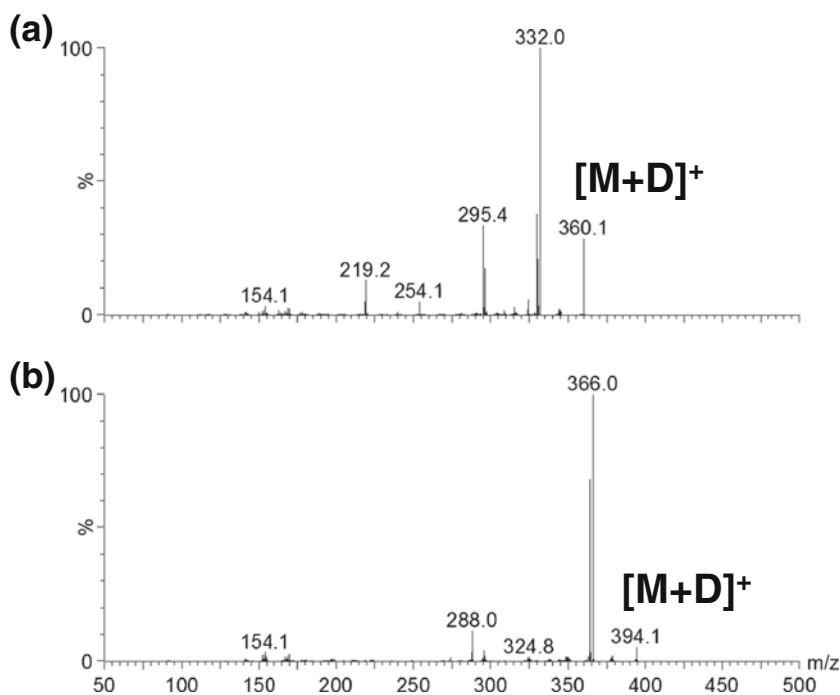
and 365 (**2**). This loss can occur through a proton transfer from the ethyl substituent to the quinoline nitrogen atom within an ion-molecule pair complex (Scheme 2). The formation of ion-molecule pair complexes is well documented in the literature; for example, Katritzky and co-workers [26] reported the formation of ion-molecule pairs for the dissociation of *N*-alkylcarbonyl- and *N*-phenoxy carbonyl-pyridinium cations. You and co-workers also reported ion-molecule complexes in the fragmentation of protonated *N*-(2-pyridinylmethyl)indole [27].

The ions resulting from the loss of ethene ( $m/z$  331 for protonated **1** and 365 for protonated **2**) can lose 78 Da, attributed to benzene, affording the ions at  $m/z$  253 (**1**) and 287 (**2**). For protonated Compound **1**, the ion at  $m/z$  253 can lose the chlorine radical affording the ion at  $m/z$  218.

Although no  $MS^n$  experiments with  $n > 2$  were performed, the occurrence of sequential product ion activation is quite probable in instruments equipped with quadrupole collision cells [28, 29]; furthermore, the breakdown diagrams for these compounds (see Figure 6a and b) clearly show that sequential activation hypothesis is feasible.

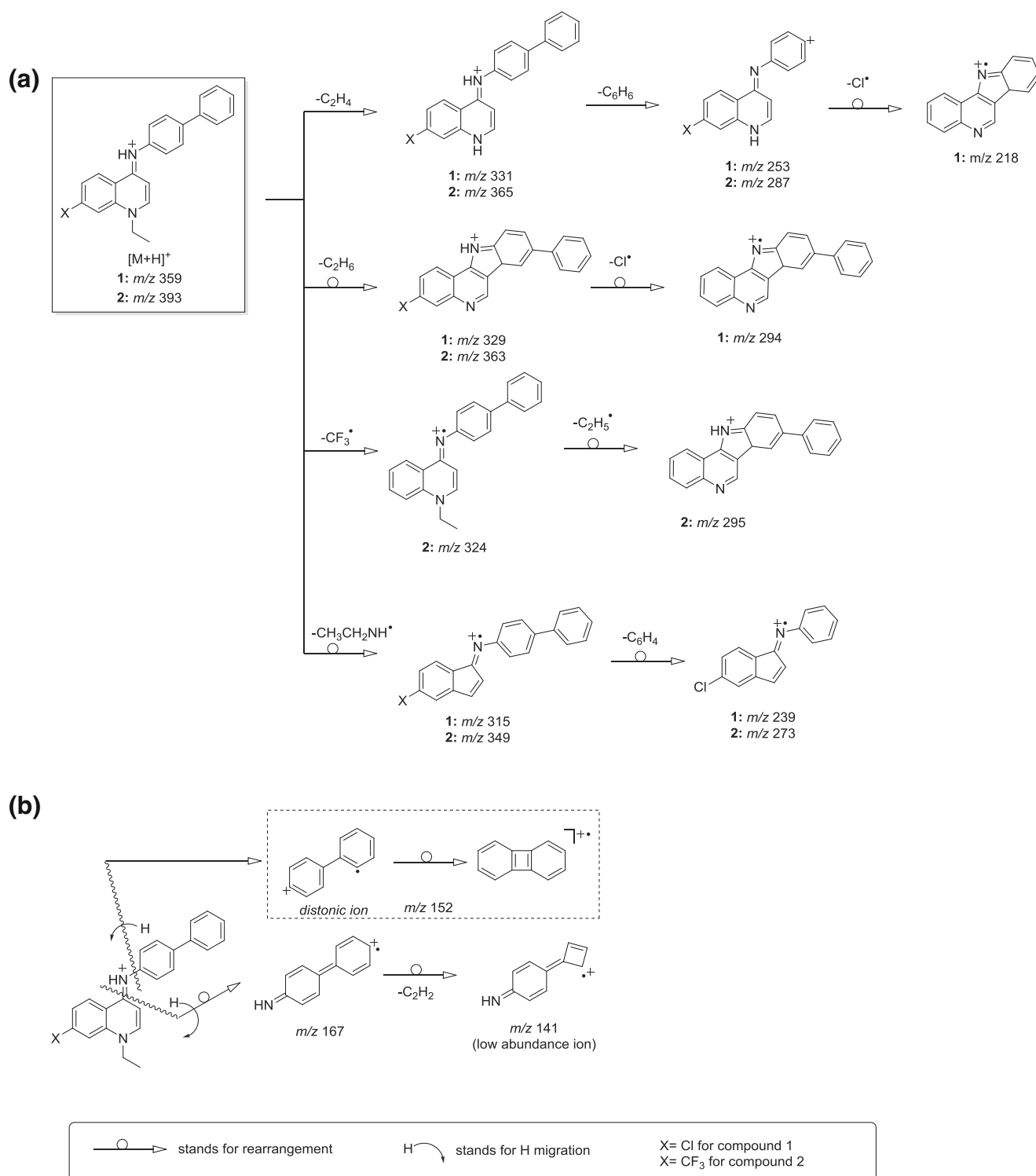
The ions at  $m/z$  329 (Compound **1**) and 363 (Compound **2**) can be formed through the loss of ethane from the corresponding protonated molecules. One could expect that the proton at the imine nitrogen would participate in this fragmentation; however, labeling experiments (Figure 4) clearly discard this possibility.

The ions at  $m/z$  329 (Compound **1**) and 363 (Compound **2**) are formed through the loss of ethane ( $C_2H_6$ , 30 Da) from the protonated molecules. For this loss to occur, hydrogen has to



**Figure 4.**  $MS^2$  data, at  $E_{lab} = 45$  eV, of  $[M+D]^+$  ion of (a) Compound **1**; (b) Compound **2**





**Scheme 3.** (a) Fragmentation pathway proposal for the protonated molecules of Compounds **1** and **2**; (b) Fragmentation pathway proposal for the formation of the ions at  $m/z$  167, 152, and 141

migrate to the ethyl substituent. The proton at the imine nitrogen could be a reasonable candidate; however, the above-mentioned labeling experiments discard this possibility. An alternative would be the migration of one neighboring hydrogen atom of the quinoline ring and the subsequent

formation of a five-membered ring. Furthermore, for protonated Compound **1** the ion at  $m/z$  329 can lose an additional 35 Da, attributed to chlorine radical, affording the ion at  $m/z$  294. Again, this can be attributed to sequential activation of the product ions (vide supra).

**Table 4.** PA Values in  $\text{kJ mol}^{-1}$ , Taken from the NIST Database [38] of Some Selected Alkylamines and Quinoline Derivatives

Compound	$\text{PA}_{\text{Literature}} / \text{kJ mol}^{-1}$
Triethylamine	981.8
Pyrrolidine	948.3
1-Methylpyrrolidine	965.6
Piperidine	954.0
1-Methylpiperidine	971.1
Dimethylpropylamine	962.8
Butyldimethylamine	969.2
Quinoline	953.2
Tetrahydroquinoline	966.0

Protonated Compounds **1** and **2** can lose  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}^+$  (44 Da) affording the ions at  $m/z$  315 (Compound **1**) and 349 (Compound **2**). This loss should occur from the quinoline ring with a subsequent ion rearrangement (formation of a five-membered ring). The ions resulting from this loss (i.e.,  $m/z$  315 and 349 for **1** and **2**, respectively) can lose 76 Da, attributed to  $\text{C}_6\text{H}_4$  from the aromatic substituent linked to the imine group, affording the ions at  $m/z$  239 (**1**) and 273 (**2**). Again, this sequential loss can be explained by sequential activation of the product ions (vide supra). Protonated Compound **2** can lose 69 Da, attributed to  $\text{CF}_3^+$ , affording the ion at  $m/z$  324. The corresponding loss for protonated **1** was not detected. It is well known that the loss of radical halogens is easier for bromine and iodine compounds than for chlorine and fluoro compounds, which can easily lose HCl or HF [30]. In fact, the ion corresponding to the loss of HCl was detected for Compound **1** at  $m/z$  323, although with a very low abundance (<5%). Furthermore, the ion at  $m/z$  324 can lose  $\text{CH}_3\text{CH}_2^+$  (29 Da) affording the ion at  $m/z$  295 by sequential activation of the product ions (vide supra).

The ions at  $m/z$  167, 152, and 141 are common to the two compounds, which mean that they must be formed by fragmentation of the aromatic system linked to the imine

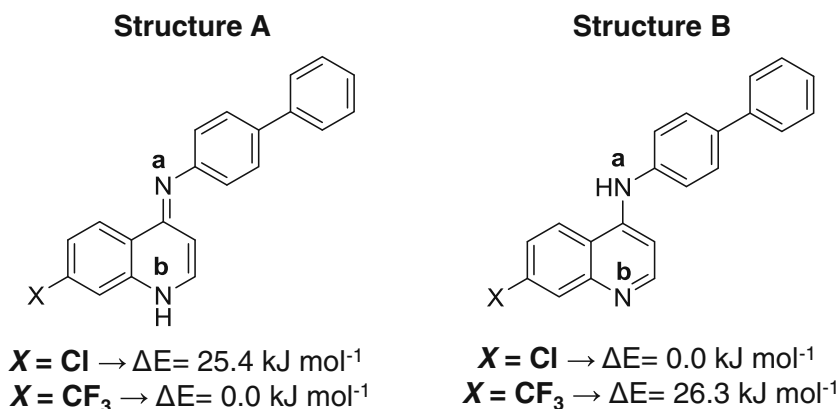
**Table 5.** PA Values, Computed at the B3LYP [19] Level of Theory, for the Possible Protonation Sites of the Aminoquinoline Scaffolds. (The Highest PA Values are Italicized)

	$\text{PA}_{\text{theor}} (\text{kJ mol}^{-1})$	
	X = Cl	X = $\text{CF}_3$
Structure <b>A</b> $\text{H}^+$ @ <i>a</i>	992.0	954.0
Structure <b>A</b> $\text{H}^+$ @ <i>b</i>	774.8	739.8
Structure <b>B</b> $\text{H}^+$ @ <i>a</i>	828.2	841.9
Structure <b>B</b> $\text{H}^+$ @ <i>b</i>	968.3	978.7

group (see Scheme 3B). The ion at  $m/z$  167 can be formed through cleavage of the  $\text{N}=\text{C}$  imine bond accompanied by the migration of a proton to the quinoline ring system. The ion at  $m/z$  152 is formed by loss of 207 Da ( $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{X}^+$ ) from the protonated molecule, by means of a hydrogen migration from the aromatic system to the quinolinoimine ring. This loss affords a distonic ion, which can rearrange to biphenylene radical cation. The ion at  $m/z$  141 results from the loss of  $\text{C}_2\text{H}_2$  from the ion at  $m/z$  167.

A closer look at Figure 2 reveals that the  $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_2\text{H}_4]^+$  ion has a greater abundance in the  $\text{MS}^2$  spectrum of protonated Compound **1**, whereas the ion corresponding to  $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_2\text{H}_6]^+$  is more abundant in the  $\text{MS}^2$  spectrum of Compound **2**, using the same  $E_{\text{lab}}$  value. The formation of  $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_2\text{H}_4]^+$  implies the migration of an hydrogen to the quinoline ring nitrogen, whereas for  $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_2\text{H}_6]^+$  to be formed it is necessary to transfer an hydrogen to the ethyl substituent. The labeling experiments show that the proton that supplies the charge does not participate in these fragmentations. Hence, for protonated Compound **1** the hydrogen migration to the quinoline ring is favored, whereas for protonated **2** it is the hydrogen transfer to the ethyl substituent.

It is noteworthy that the large number of odd-electron product ions formed by dissociation of the protonated molecules (even-electron ion) of Compounds **1** and **2**, in a



**Figure 5.** Possible structures and relative energies for the neutrals lost during the CID of protonated Compounds **3–12** (*a* and *b* denote the possible protonation sites, *X* denotes either Cl or  $\text{CF}_3$ )

clear violation of the “even-electron rule” [31]. However, there are numerous reports on exceptions to this rule [32–36]. The exceptions from the “even-electron rule” can be rationalized by energetic considerations (i.e., even-electron product ions, specifically those generated from small aromatic molecules, are not necessarily more stable than the odd-electron counterparts [33]).

The observations described so far are summarized in Scheme 3A and B, which depict the fragmentation pathway proposal for the protonated molecules of Compounds 1 and 2.

Protonated Compounds 3–12 show a very simple fragmentation pattern with only one/two product ions; the second product ion has an abundance lower than 1% at a collision energy of 15 eV, nevertheless, at 30 eV the abundance of the secondary product ion increases to 5%–20% (Table 2). The most abundant product ion corresponds to the cleavage of the C-quinoline nitrogen bond affording the alkylamine ions at  $m/z$  100 (Compounds 3 and 4),  $m/z$  126 (Compounds 5 and 6),  $m/z$  128

(Compounds 7 and 8),  $m/z$  98 (Compounds 9 and 10), and  $m/z$  114 (Compounds 11 and 12). Contrary to what was observed for protonated Compounds 1 and 2, the ion corresponding to the aminoquinoline structure (at  $m/z$  331) was not detected. Katritzky and co-workers [26] reported a similar behavior for *N*-aroyl- and *N*-heteroaroyl-pyridinium cations, which dissociate cleanly to form  $\text{ArCO}^+$  cations; however, the main driving force for this to occur was attributed to stabilization of the  $\text{ArCO}^+$  by electron donor groups, which is not applicable in our case. Another possibility to explain this behavior could lie in Field’s rule. This rule states that in even-electron ion decompositions, the tendency of a neutral to leave without the charge is greater for molecules of lower proton affinity [31, 37]. For Compounds 1 and 2, where the ion corresponding to the aminoquinoline scaffold (resulting from the loss of ethene) was detected, the proton affinity of ethene (the neutral lost during CID) is ca.  $680 \text{ kJ mol}^{-1}$  [38]; hence, it is reasonable to assume that the aminoquinoline scaffold has a PA value greater

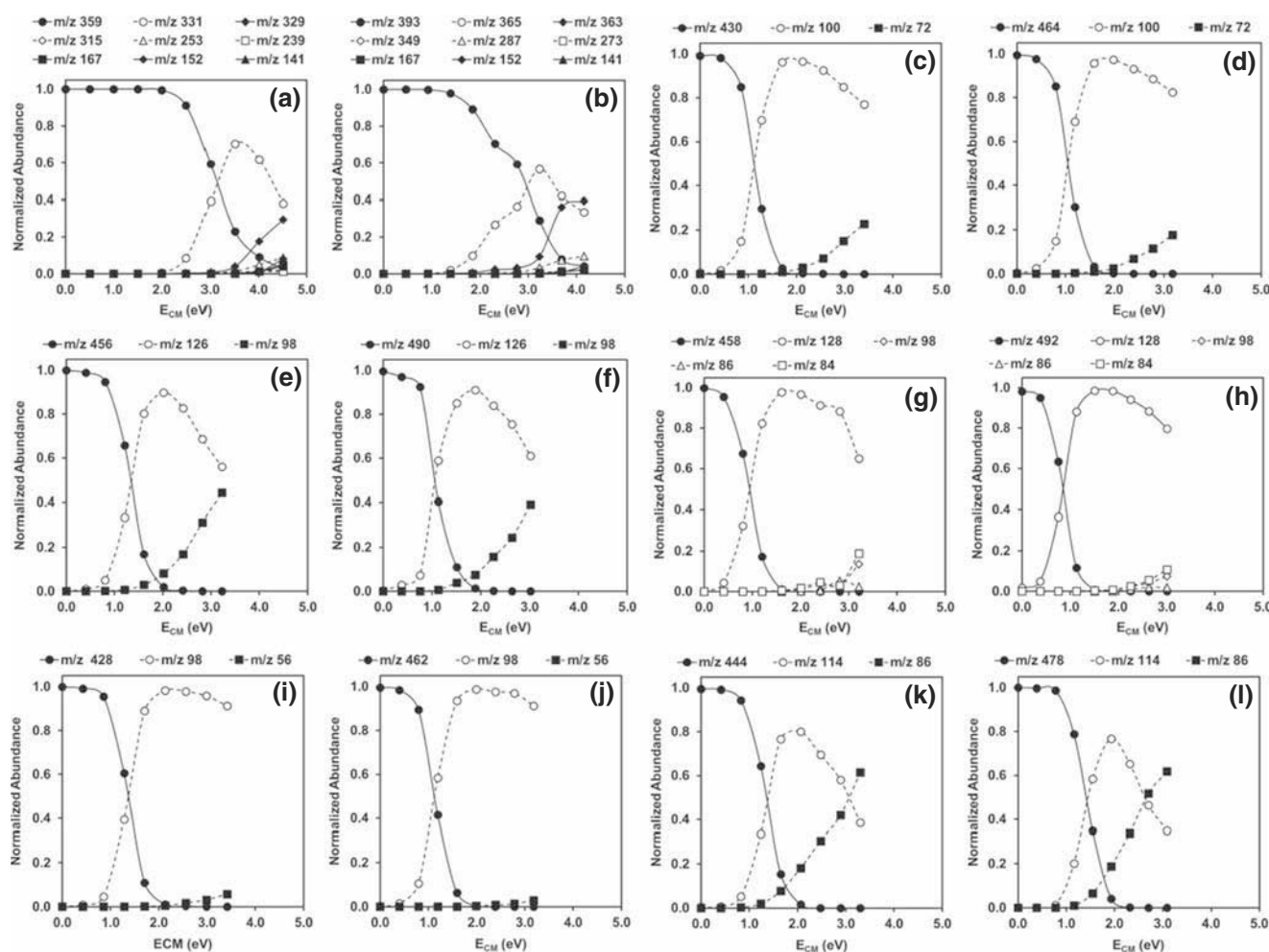


Figure 6. Breakdown diagrams for protonated molecule of (a) Compound 1; (b) Compound 2; (c) Compound 3; (d) Compound 4; (e) Compound 5; (f) Compound 6; (g) Compound 7; (h) Compound 8; (i) Compound 9; (j) Compound 10; (k) Compound 11; (l) Compound 12

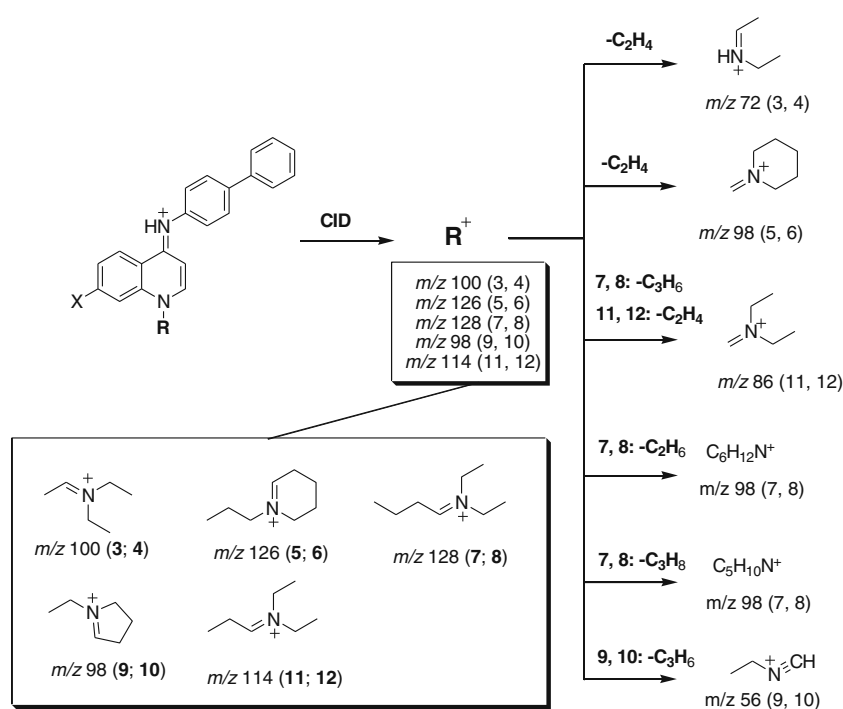
than  $680 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Compounds **3–12** have alkylamines as substituents of the quinoline nitrogen, which are known to possess large proton affinity values; for instance, triethylamine has a PA of ca.  $982 \text{ kJ mol}^{-1}$  [38]. Unfortunately, for the remaining alkylamines, the NIST database does not have any PA values. Considering similar alkylamines, see Table 4; it is reasonable to assume that the aminoquinoline scaffold has a proton affinity lower than ca.  $980 \text{ kJ mol}^{-1}$ . As such, we can bracket the aminoquinoline scaffold proton affinity value in the range of  $680\text{--}980 \text{ kJ mol}^{-1}$ . It is clear that the bracketing range is quite large,  $300 \text{ kJ mol}^{-1}$ ; however, one must take into account that proton affinity determinations are not at the core of the present study and that there are other methodologies that could be used to determine such thermochemical properties, namely the kinetic method. Furthermore, the proton affinity of quinoline and tetrahydroquinoline derivatives (see Table 4) are well within the upper limit of the aforementioned range. Theoretical calculations at the B3LYP level of theory and using the 6-311+G(d,p) basis set were employed to compute the PA value of the aminoquinoline scaffolds. Each aminoquinoline neutral can adopt two different structures, which are depicted in Figure 5, and each structure has two possible protonation sites. The predicted PA values for each possible structure are presented in Table 5.

Interestingly, the structure of the neutral will depend on the substituent  $X$ . When  $X=\text{Cl}$ , structure **B** is energetically

more favored, whereas when  $X=\text{CF}_3$ , structure **A** is favored. It is well-known that chlorine donates electron density to the aromatic ring (activator or ortho/para director) whereas  $\text{CF}_3$  withdraws electron density from the ring (deactivator or meta director) [39]. It seems that the electron donating properties of chlorine makes possible the delocalization along the quinolon-4(*1H*)-imine scaffold, thus making structure **B** energetically more favored, whereas for  $\text{CF}_3$ , such delocalization is not possible since it withdraws electron density from the aromatic system.

The computed PA values clearly show that protonation at site **a** is favored for compounds with  $X=\text{Cl}$ , whereas for compounds bearing  $\text{CF}_3$ , protonation at site **b** is favored. It is clear that the computed values are in agreement with the predicted range (vide supra), which could lead us to conclude that Field's rule is governing this fragmentation. However, we feel that further studies are needed, and the determination of the proton affinity of the aminoquinoline scaffold together with theoretical calculations using more sophisticated functionals will certainly shed light on this subject in a future publication.

The alkylamine ions ( $\text{R}^+$ ) can suffer additional activation in the triple quadrupole's collision cell and fragment. For protonated **5**, **6**, **7**, **8**, **11**, and **12** the formation of the immonium ion through  $\alpha$ -cleavage was detected: **5**, **6**:  $m/z$  98; **7**, **8**:  $m/z$  86 (although with a low abundance); **11**, **12**:  $m/z$  86. Interestingly, fragmentation of the product ions of protonated **3**, **4**, **9**, and **10** did not afford the characteristic immonium ion. Instead, it was detected the loss of  $\text{C}_2\text{H}_4$



**Scheme 4.** Fragmentation pathway proposal for the protonated molecules of Compounds **3–12**. (The structures shown in the box are the most stable ones at DFT level of theory)

(28 Da) most probably through a  $\beta$ -hydrogen transfer reaction [30] for protonated **3** and **4** affording the ion at  $m/z$  72, whereas for protonated **9** and **10** the product ion at  $m/z$  98 loses 42 Da ( $C_3H_8$ ) affording the ion at  $m/z$  56. The fragmentation of the  $R^+$  product ion of Compounds **7** and **8** affords two additional ions, one at  $m/z$  98 resulting from the loss of 30 Da ( $C_2H_6$ ) and the other at  $m/z$  84 attributed to the loss of 44 Da ( $C_3H_8$ ). The breakdown diagrams for each protonated molecule (see Figure 6) clearly show that the hypothesis of sequential activation in the triple quadrupole's collision cell is quite feasible since at a certain value of  $E_{CM}$  the abundance of the product ion starts to decrease, whereas the abundance of the second product ion increases. The fragmentation pathway proposal for protonated Compounds **3–12** is depicted in Scheme 4.

## Conclusions

The gas-phase behavior of 12 quinolon-4(*1H*)-imine derivatives, potent antiplasmodial compounds targeting both the liver and the blood stage of malaria parasite, was addressed in this report. Fragmentation pathways of the protonated molecules and product ion structures were proposed, taking into account density functional theory calculations.

Probable protonation sites were proposed by calculating the proton affinity using theoretical calculations, and the most probable protonation site was the imine nitrogen for all quinolon-4(*1H*)-imine derivatives under study. Protonation at the alkylamine nitrogen (where present) afforded the second most stable species, although with energies ca. 100 kJ mol<sup>-1</sup> higher than the most stable ones. Protonation at the quinoline nitrogen is energetically not favored ( $\Delta E$  ca. 200 kJ mol<sup>-1</sup>).

The nature of the quinoline substituent clearly influences the gas-phase behavior of the compounds under study. When the substituent is  $-CH_2CH_3$  the fragmentation of the protonated molecule is quite extensive, whereas when the substituent is an alkylamine only one or two product ions are formed. This was attributed to the formation and sequential activation of the quinolin-4-imine ion for the compounds bearing the ethyl substituent at the quinoline nitrogen, ion not detected when the quinoline nitrogen substituent was an alkylamine. This behavior also allowed bracketing the proton affinity of the quinolin-4-imine scaffold between 680 and 980 kJ mol<sup>-1</sup>. Although it is a large proton affinity range, it will be a useful starting point to choose appropriate references for determining PA values of this scaffold using, for example, the kinetic method (either in its restricted or extended form). Furthermore, the large number of odd-electron product ions formed by dissociation of even-electron species (a clear violation of the “even-electron rule”) was rationalized by energetic considerations (i.e., even-electron product ions generated from small aromatic molecules, are not necessarily more stable than the odd-electron counterparts).

## Acknowledgments

P.J.A.M. acknowledges Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) for the post-doctoral grant (SFRH/BPD/86948/2012). A.R.F.S. and T.R. acknowledge FCT for their Ph.D. grants (ARFS - SFRH/BD/51459/2011; TR - SFRH/BD/30689/2006). The authors acknowledge FCT for financial support through the following projects: REDE/1518/REM/2005; PEst-OE/SAU/UI4013/2014; PTDC/SAU-FCT/098734/2008.

## References

1. World Malaria Report. World Health Organization: Geneva (2013)
2. Ressurreição, A.S., Gonçalves, D., Siteo, A.R., Albuquerque, I.S., Gut, J., Góis, A., Gonçalves, L.M., Bronze, M.R., Hanscheid, T., Biagini, G.A., Rosenthal, P.J., Prudêncio, M., O'Neill, P., Mota, M.M., Lopes, F., Moreira, R.: Structural optimization of quinolon-4(*1H*)-imines as dual-stage antimalarials: towards increased potency and metabolic stability. *J. Med. Chem.* **56**, 7679–7690 (2013)
3. Murray, C.J.L., Rosenfeld, L.C., Lim, S.S., Andrews, K.G., Foreman, K.J., Haring, D., Fullman, N., Naghavi, M., Lozano, R., Lopez, A.D.: Global malaria mortality between 1980 and 2010: a systematic analysis. *Lancet* **379**, 413–431 (2012)
4. Alonso, P.L., Brown, G., Arevalo-Herrera, M., Binka, F., Chitnis, C., Collins, F., Doumbo, O.K., Greenwood, B., Hall, B.F., Levine, M.M., Mendis, K., Newman, R.D., Plowe, C.V., Rodríguez, M.H., Sinden, R., Slutsker, L., Tanner, M.: A research agenda to underpin malaria eradication. *PLOS Med.* **8**, e1000406 (2011)
5. Alonso, P.L., Djimde, A., Kremsner, P., Magill, A., Milman, J., Najera, J., Plowe, C.V., Rabinovich, R., Wells, T., Yeung, S.: A research agenda for malaria eradication drugs. *PLOS Med.* **8**, e1000402 (2011)
6. Wells, T.N.C., Burrows, J.N., Baird, J.K.: Targeting the hypnozoite reservoir of *Plasmodium vivax*: the hidden obstacle to malaria elimination. *Trends Parasitol.* **26**, 145–151 (2010)
7. Rodrigues, T., Prudêncio, M., Moreira, R., Mota, M.M., Lopes, F.: Targeting the liver stage of malaria parasites: a yet unmet goal. *J. Med. Chem.* **55**, 995–1012 (2012)
8. Kostianen, R., Kotiaho, T., Kuuranen, T., Auriola, S.: Liquid chromatography/atmospheric pressure ionization-mass spectrometry in drug metabolism studies. *J. Mass Spectrom.* **38**, 357–372 (2003)
9. Hodel, E.M., Zanolari, B., Mercier, T., Biollaz, J., Keiser, J., Olhoffer, P., Genton, B., Decosterd, L.A.: A single LC-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of 14 antimalarial drugs and their metabolites in human plasma. *J. Chromatogr. B* **877**, 867–886 (2009)
10. Zuo, F., Nakamura, N., Akao, T., Hattori, M.: Pharmacokinetics of berberine and its main metabolites in conventional and pseudo germ-free rats determined by liquid chromatography/ion trap mass spectrometry. *Drug Metab. Dispos.* **34**, 2064–2072 (2006)
11. Nyadong, L., Green, M.D., De Jesus, V.R., Newton, P.N., Fernández, F.M.: Reactive desorption electrospray ionization linear ion trap mass spectrometry of latest-generation counterfeit antimalarials via noncovalent complex formation. *Anal. Chem.* **79**, 2150–2157 (2007)
12. Ifa, D.R., Jackson, A.U., Paglia, G., Cooks, R.G.: Forensic applications of ambient ionization mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **394**, 1995–2008 (2009)
13. Siteo, A.R., Lopes, F., Moreira, R., Coelho, A.V., Bronze, M.R.: Contribution of Mass Spectrometry to the Study of Antimalarial Agents. In “Tandem Mass Spectrometry - Molecular Characterization”: Coelho, A.V. (ed.) InTech, Rijeka (2013). doi:10.5772/56225
14. Vale, N., Matos, J., Moreira, R., Gomes, P.: Electrospray ionization mass spectrometry as a valuable tool in the characterization of novel primaquine peptidomimetic derivatives. *Eur. J. Mass Spectrom.* **15**, 627–40 (2009)
15. Vale, N., Matos, J., Moreira, R., Gomes, P.: Electrospray ionization-ion trap mass spectrometry study of PQAAPro and PQProAA mimetic derivatives of the antimalarial primaquine. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **19**, 1476–1490 (2008)
16. Vale, N., Moreira, R., Gomes, P.: Characterization of primaquine imidazolidin-4-ones with antimalarial activity by electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **270**, 81–93 (2008)

17. Rodrigues, T., da Cruz, F.P., Lafuente-Monasterio, M.J., Gonçalves, D., Ressurreição, A.S., Siteo, A.R., Bronze, M.R., Gut, J., Schneider, G., Mota, M.M., Rosenthal, P.J., Prudêncio, M., Gamo, F.-J., Lopes, F., Moreira, R.: Quinolin-4(1H)-imines are potent antiplasmodial drugs targeting the liver stage of malaria. *J. Med. Chem.* **56**, 4811–4815 (2013)
18. Frisch, M.J., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G.E., Robb, M.A., Cheeseman, J.R., Montgomery Jr., J.A., Vreven, T., Kudin, K.N., Burant, J.C., Millam, J.M., Iyengar, S.S., Tomasi, J., Barone, V., Mennucci, B., Cossi, M., Scalmani, G., Rega, N., Petersson, G.A., Nakatsuji, H., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Klene, M., Li, X., Knox, J.E., Hratchian, H.P., Cross, J.B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R.E., Yazyev, O., Austin, A.J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J.W., Ayala, P., Morokuma, K., Voth, G.A., Salvador, P., Dannenberg, J.J., Zakrzewski, V.G., Dapprich, S., Daniels, A.D., Strain, M.C., Farkas, O., Malick, D.K., Rabuck, A.D., Raghavachari, K., Foresman, J.B., Ortiz, J.V., Cui, Q., Baboul, A.G., Clifford, S., Cioslowski, J., Stefanov, B.B., Liu, G., Liashenko, A., Piskorz, P., Komaromi, I., Martin, R.L., Fox, D.J., Keith, T., Al-Laham, M.A., Peng, C.Y., Nanayakkara, A., Challacombe, M., Gill, P.M.W., Johnson, B., Chen, W., Wong, M.W., Gonzalez, C., Pople, J.A.: Gaussian 03, Revision D.01. Gaussian, Inc, Wallingford (2004)
19. Becke, A.D.: Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* **98**, 5648–5652 (1993)
20. Lee, C., Yang, W., Parr, R.G.: Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B* **37**, 785–789 (1988)
21. Marvin, Version 6.2.2. ChemAxon (2014)
22. Hanwell, M., Curtis, D., Lonie, D., Vandermeersch, T., Zurek, E., Hutchison, G.: Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J. Cheminformatics* **4**, 17 (2012)
23. Pigatto, M.C., Lima, M.C.A., Galdino, S.L., Pitta Ida, R., Vessecchi, R., Assis, M.D., Santos, J.S., Costa, T.D., Lopes, N.P.: Metabolism evaluation of the anticancer candidate AC04 by biomimetic oxidative model and rat liver microsomes. *Eur. J. Med. Chem.* **46**, 4245–4251 (2011)
24. Rogalewicz, F., Hoppilliard, Y., Ohanessian, G.: Fragmentation mechanisms of  $\alpha$ -amino acids protonated under electrospray ionization: a collisional activation and ab initio theoretical study. *Int. J. Mass Spectrom.* **195/196**, 565–590 (2000)
25. Maksić, Z.B., Kovačević, B.: Toward organic superbases: the electronic structure and the absolute proton affinity of quinodiimines and some related compounds. *J. Phys. Chem. A* **102**, 7324–7328 (1998)
26. Katritzky, A.R., Burton, R.D., Shipkova, P.A., Qi, M., Watson, C.H., Eyler, J.R.: Collisionally activated dissociation of *N*-acylpyridinium cations. *J. Chem. Soc., Perkin Trans* **2**, 835–840 (1998)
27. You, Z., Guo, C., Pan, Y.: An experimental and theoretical study on fragmentation of protonated *N*-(2-pyridinylmethyl)indole in electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **26**, 2509–2516 (2012)
28. Sleno, L., Volmer, D.A.: Ion activation methods for tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **39**, 1091–112 (2004)
29. Hopfgartner, G., Varesio, E., Tschappat, V., Grivet, C., Bourgogne, E., Leuthold, L.A.: Triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer for the analysis of small molecules and macromolecules. *J. Mass Spectrom.* **39**, 845–855 (2004)
30. Dass, C.: Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry. Wiley, Hoboken (2007), 244–246
31. McLafferty, F.W., Turecek, F.: Interpretation of Mass Spectra, 4th edn. University Science Books, Sausalito (1993), 54–55
32. Thurman, E.M., Ferrer, I., Pozo, O.J., Sancho, J.V., Hernandez, F.: The even-electron rule in electrospray mass spectra of pesticides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **21**, 3855–368 (2007)
33. Levsen, K., Schiebel, H.M., Terlouw, J.K., Jobst, K.J., Elend, M., Preiss, A., Thiele, H., Ingendoh, A.: Even-electron ions: a systematic study of the neutral species lost in the dissociation of quasi-molecular ions. *J. Mass Spectrom.* **42**, 1024–44 (2007)
34. Chen, K., Rannulu, N.S., Cai, Y., Lane, P., Liebl, A.L., Rees, B.B., Corre, C., Challis, G.L., Cole, R.B.: Unusual odd-electron fragments from even-electron protonated prodigine precursors using positive-ion electrospray tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **19**, 1856–66 (2008)
35. Lehner, A.F., Craig, M., Fannin, N., Bush, L., Tobin, T.: Fragmentation patterns of selected ergot alkaloids by electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **39**, 1275–1286 (2004)
36. Holcapek, M., Jirasko, R., Lisa, M.: Basic rules for the interpretation of atmospheric pressure ionization mass spectra of small molecules. *J. Chromatogr. A* **1217**, 3908–3921 (2010)
37. Guan, F., Soma, L., Luo, Y., Uboh, C., Peterman, S.: Collision-induced dissociation pathways of anabolic steroids by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **17**, 477–489 (2006)
38. Lias, S.G., Bartmess, J.E., Liebman, J.F., Holmes, J.L., Levin, R.D., Mallard, W.G.: Ion Energetics Data. In: Linstrom, P.J., Mallard, W.G. (eds.) NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69. National Institute of Standards and Technology: Gaithersburg MD, 20899
39. Smith, M.B., March, J.: March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 6th edn. Wiley, Hoboken (2007), 665–670